UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Instituto de Agroindustrias

EVALUACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO DURANTE EL PROCESO DE DEGRADACIÓN AEROBIA DE LA EXCRETA DE BOVINO Y SU APLICACIÓN EN UN SUELO DE ORIGEN VOLCÁNICO.

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

BÁRBARA SUSANA FUENTES SIEGMUND

TEMUCO-CHILE
2009

Evaluación de la disponibilidad de fósforo durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino y su aplicación en un suelo de origen volcánico.

Esta tesis fue realizada bajo la supervisión de la Directora de Tesis, Dra. María de la Luz Mora Gil, del Departamento de Ciencias Químicas y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

Bárbara Susana Fuentes Siegmund

DIRECTOR PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

Dra. María de la Luz Mora

Dr. Fernando Borie

Dra. María Cristina Díez

Dr. Mauricio Escudey

Dr. Gerardo Galindo

DIRECTOR DIRECCIÓN DE POSTGRADO UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

A mis Padres, a Eduardo y a Constanza…

AGRADECIMIENTOS

En esta oportunidad quisiera agradecer a mi tutora de tesis la Dra. María de la Luz Mora por haberme permitido desarrollar la tesis doctoral junto a su equipo de trabajo, y por haber contribuido con mi formación profesional y científica; a los docentes del programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales, especialmente a la Dra. Alejandra Jara, a la Dra. Paula Cartes y al Dr. Milko Jorquera. Quisiera agradecer también a la Dra. María Cristina Diez, al Dr. Rodrigo Navia y al Dr. Cristian Bornhardt por haberme apoyado en las etapas iniciales de investigación científica, y al Dr. Roland Bol quien fue mi supervisor durante la estadía de investigación en el Institute of Grassland and Environmental Research (IGER, North Wyke Research) UK.

Quisiera expresar mi gratitud a todos los funcionarios del Laboratorio de Suelos y Plantas del Instituto de Agroindustria de la Universidad de La Frontera, en especial a la Sra. Brígida Sobarzo, a la Srta. Juanita Cisterna, a la Sra. Olga López y a la Srta. Evelyn Stohmann, y a la Sra. Noelia Sepúlveda del Departamento de Ciencias Químicas.

Agradezco el apoyo incondicional de mis grandes amigos: Loreto Hernández, María Paz Oyarzún, Lina Agouborde, Paulina Etcheverría y Gabriela Briceño, y especialmente quisiera destacar la ayuda y el optimismo entregado por mi compañero de laboratorio Pedro Nuñez.

El desarrollo de la tesis doctoral fue posible gracias al financiamiento del proyecto MECESUP FRO 0309, al financiamiento de tesis doctoral CONICYT AT-24060247 y a los fondos del Laboratorio de Suelos y Plantas de la Universidad de la Frontera. La estadía de Investigación fue financiada por el Proyecto Fundación Andes C14055.

RESUMEN

La excreta de bovino presenta altos contenidos de fósforo (P), este macronutriente puede ser reciclado en el sistema suelo-planta-animal. La eficiencia de este residuo como fertilizante dependerá de los procesos de degradación de la materia orgánica y de las interacciones del P inorgánico (Pi) y del P orgánico (Po) que se generan en el residuo y en el suelo.

Los objetivos de esta investigación fueron estudiar la disponibilidad de P durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino; evaluar la disponibilidad de P en un suelo volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD); identificar bacterias que utilizan fitato (BUF) durante el proceso de degradación aerobia, y estudiar la capacidad de distintos ácidos orgánicos (ácido cítrico, málico, oxálico y glucónico) para liberar Pi, desde la EBD.

La degradación de la excreta de bovino se llevó a cabo, en reactores aerobios a escala de laboratorio, por un periodo 105 días. Durante los primeros 40 días de degradación se observó un incremento de la concentración de Pi extraído en agua (desde 550 hasta 1890 mg kg^{-1}) y de P biomásico (desde 390 hasta 870 mg kg^{-1}). Después de este periodo, la concentración de Pi en agua se mantuvo en 1500 mg kg^{-1} aproximadamente, mientras que la concentración de P biomásico decreció hasta 220 mg kg^{-1}. El fraccionamiento secuencial de P mostró que el Po decreció en las fracciones de $NaHCO_3$, de NaOH y de HCl, en tanto que incrementó el contenido de P en la fracción residual, desde un 23 a un 52% del P total.

Los análisis bacterianos, realizados durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino, mostraron la presencia de distintos morfotipos de bacterias que utilizan fitato (BUF). Los morfotipos encontrados fueron identificados como miembros de los géneros *Bacillus, Escherichia, Enterobacter, Ochrobactrum, Rahnella, Shigella and Streptomyces*. Los morfotipos *Enterobacter* y *Rahnella* fueron dominantes al final del proceso de degradación y mostraron una eficiente capacidad para utilizar fitato. Adicionalmente, los aislados *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-95 mostraron capacidad para solubilizar fosfato de calcio y exhibieron actividad fosfatasa (fosfatasa ácida, alcalina y fosfohidrolasa). Las pruebas de inoculación de la EBD con los aislados *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-95 en la EBD, mostraron un aumento de la disponibilidad de Pi con

respecto a la EBD control; en presencia de *Enterobacter* sp. B-95 el Pi disponible incrementó en un 27% y en presencia de *Rahnella* sp. D-95 el Pi incrementó en un 22%.

Los ácidos orgánicos mostraron capacidad para liberar Pi desde la EBD. Los estudios cinéticos mostraron que la cantidad de Pi liberado depende del ácido aplicado y de su concentración. En el tiempo de equilibrio (16 h) la liberación de Pi incrementó en un 36%, 31%, 30% y 12% con la aplicación de ácido cítrico, oxálico, glucónico y málico, respectivamente; con respeto a la EDB control.

La aplicación de la EBD en un suelo volcánico (serie Piedras Negras) incrementó la concentración de P biodisponible. Después de 64 días de incubación, se observó que la concentración de P total disponible, extraída en bicarbonato de sodio, incrementó en un 14, 21, 39 y 83% con respecto al suelo control, cuando se utilizaron las dosis de 3, 6, 9 y 18 mg EBD g^{-1} suelo, respectivamente. En forma similar, el Pi disponible incrementó en un 1,3; 2,7; 3,9 y 5,8 veces con respecto al suelo control, cuando se utilizaron dosis de 3, 6, 9 y 18 mg EBD kg^{-1}suelo, respectivamente. A medida que se aumentó la dosis de aplicación de EDB, se observó un incremento del Pi disponible en el suelo. La aplicación de 18 mg EBD kg^{-1} suelo, incrementó en un 35% el Po disponible con respecto al suelo control, después de 64 días de incubación.

La aplicación de EDB modificó la concentración de P y de los ácidos orgánicos en la rizósfera de *Lolium perenne*. La concentración de fosfato en la rizósfera tuvo relación con la concentración de los aniones orgánicos y con la captación de P por *Lolium perenne.* Citrato, malato, oxalato y formiato se cuantificaron en la solución rizosférica; el citrato y el acetato estuvieron presentes en mayor cantidad (alrededor de 30 µM) y mostraron correlación inversa con el fosfato. La mayor concentración de fosfato (5 µM) se detectó en la solución rizosférica del suelo control; por el contrario, la menor concentración de fosfato se detectó en presencia de 18 mg EBD kg^{-1} suelo, lo cual se debió a la mayor captación de fosfato por *Lolium perenne*.

SUMMARY

Cattle dung contains high amounts of phosphorus (P), a macronutrient which can be recycled in the soil-plant-cattle system. The efficiency of cattle dung as a fertilizer depends on the organic matter degradation process and several interactions between inorganic phosphorus (Pi) and organic phosphorus (Po) compounds in the waste and in the soil. Improving the availability of phosphorus from organic waste would contribute to the sustainability of the phosphorus cycle.

The aims of this investigation were to study the availability of phosphorus during the aerobic degradation of cattle dung; to evaluate the availability of phosphorus in volcanic soil amended with degraded cattle dung (DCD); to identify phytate-utilizing bacteria (PUB) during the aerobic degradation of cattle dung; and to study the effect of different organic acids (citric, malic, oxalic and gluconic acids) on the release of Pi from DCD.

The degradation process of dairy cattle dung was carried out in laboratory-scale aerobic reactors for 105 days. The results showed an increase in water-soluble inorganic P (Pi) (from 570 to 1890 mg kg^{-1}) and in biomass P (from 390 to 870 mg kg^{-1}) during the initial 40 days. After this period, water-soluble Pi remained constant at approximately 1500 mg kg^{-1}, and biomass P decreased (from 870 to 220 mg kg^{-1}). Sequential P fractionation showed a decrease in Po in $NaHCO_3$, NaOH and HCl fractions and showed an increase in P in the residual fraction, from 23 to 52% of the total P.

Bacteriological analyses showed various types of phytate-utilizing bacteria (PUB) involved in cattle dung degradation. They were genetically characterized as members of the genera *Bacillus, Escherichia, Enterobacter, Ochrobactrum, Rahnella, Shigella and Streptomyces*. *Enterobacter* and *Rahnella* were dominant in the final period of the degradation process, showing strong utilization of phytate *in vitro* on agar plates. In addition, the *Enterobacter* sp. B-95 and *Rahnella* sp. D-75 isolates showed the capacity to use calcium phosphate and exhibited phosphatase activity (acid phosphatase, alkaline phosphatase and phosphohydrolase). The inoculation tests using *Enterobacter* sp. B-95 and *Rahnella* sp. D-75 isolates in the DCD increased the concentration of available Pi compared to the control

DCD; with *Enterobacter* sp. B-95 available Pi increased 27% and with *Rahnella* sp. D-75 available P increased 22%.

Organic acids showed the capacity to release Pi from the DCD. The kinetics studies showed that the quantity of Pi released was dependent upon the organic acid added and its concentration. In the EQ-time (16 h), the Pi released increased 36, 31, 30 and 12% with the application of citric, oxalic, gluconic and malic acids respectively, compared to the control DCD.

The application of the DCD to a volcanic soil (Piedras Negras series) increased the available P. After 64 days of incubation the available total P, extracted in sodium bicarbonate, increased 14, 21, 39 and 83%, compared with the control soil, when applying doses of 3, 6, 9 and 18 mg DCD kg^{-1} soil, respectively. Similarly, the available Pi increased 1.3; 2.7; 3.9 and 5.8 times compared to the control soil when applying doses of 3, 6, 9 and 18 mg DCD kg^{-1} soil, respectively. Amended soils showed an increase of available Pi as the doses of DCD application were increased. The Po was an 85% of the available Pt in the control soil. The application of 18 mg DCD kg^{-1} soil increased the available Po by 35% compared to the control soil after 64 days of incubation.

The application of DCD modified the concentrations of P and organic acids in the rhizosphere of *Lolium perenne*. The phosphate concentration in the rhizosphere was related to the concentration of organic anions and the P uptake by the plants. Citrate, acetate, oxalate and formate were quantified in the rhizospheric solution. Citrate and acetate were present in major concentration, around 30 µM, and showed inverse correlation with the phosphate. The highest phosphate concentration (5 µM) was found in the control rhizospheric solution, whereas a low concentration was detected in the presence of the highest dose of DCD, which was due to phosphate uptake by the plants.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN. 1

1.1. Antecedentes generales. 1

1.2. Hipótesis de trabajo. 3

1.3. Objetivos. 4

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS. 5

2.1. Compuestos de fósforo en el medio ambiente. 5

2.2. Factores que afectan la disponibilidad de fósforo en el suelo. 7

2.3. El fósforo en los residuos orgánicos y su incorporación en el suelo. 10

2.4. El fósforo durante el proceso de degradación aerobia de los residuos orgánicos. 11

2.5. Técnicas utilizadas para el estudio del fósforo en los residuos orgánicos. 12

2.5.1. Fraccionamiento secuencial de fósforo. 12

2.5.2. Resonancia magnética nuclear (RMN). 12

2.6. Relación de los ácidos orgánicos y de las enzimas fosfatasas con la disponibilidad de fósforo. 13

2.6.1. Ácidos orgánicos. 13

2.6.2. Enzimas fosfatasas. 15

2.7. Los microorganismos y la disponibilidad de fósforo. 16

2.8. Estudios de fósforo en la rizósfera. 18

3. MATERIALES Y MÉTODOS 20

3.1. Recolección y caracterización de la excreta de bovino. 21

3.1.1. Recolección de la excreta de bovino. 21

3.1.2. Análisis de elementos totales. 21

3.2. Implementación y seguimiento del proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino. 21

3.2.1. Recolección de la excreta de bovino 21

3.2.2. Implementación del sistema de degradación aerobia. 22

3.2.3. Análisis realizados durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 24
3.2.4. Análisis bacteriológicos realizados durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 27
3.3. Inoculación de BUF en la excreta de bovino degradada (EBD). 29
3.3.1. Preparación del inóculo inicial. 30
3.3.2. Inoculación de las BUF en la EBD. 30
3.3.3. Análisis estadísticos. 30
3.4. Aplicación de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD). 30
3.4.1. Cinética de liberación de fósforo. 30
3.4.2. Isotermas de liberación de fósforo y de adsorción de ácidos orgánicos. 31
3.4.3. Determinación de ácidos orgánicos. 33
3.4.4. Análisis estadísticos. 33
3.5. Aplicación de la excreta de bovino degradada (EBD) en un suelo de origen volcánico. 33
3.5.1. Incubación de un Andisol con EBD. 33
3.5.2. Análisis estadísticos. 35
3.6. Estudios de la disponibilidad de P en la rizósfera de *Lolium perenne*, utilizando un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD) 35
3.6.1. Diseño de los rizotrones. 35
3.6.2. Plántulas utilizadas. 36
3.6.3. Montaje de los rizotrones. 36
3.6.4. Análisis realizados en la solución rizosférica. 37
3.6.5. Análisis estadísticos. 38

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 39
4.1. Caracterización de la excreta de bovino. 39
4.2. Ensayo de degradación aerobia de la excreta de bovino. 40
4.2.1. Monitoreo de la temperatura y del pH. 40
4.2.2. Dinámica de Pi en agua y de P biomásico. 42
4.2.3. Dinámica de Al, Fe y Ca intercambiables. 45

4.2.4. Distribución de las fracciones de fósforo. 46
2.4.5. Actividad enzimática fosfatasa ácida y alcalina. 52
4.2.6. Análisis de ^{31}P RMN. 54
4.2.7 Identificación y caracterización de bacterias que utilizan fitato (BUF), aisladas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 56
4.3. Incubación de BUF en la excreta de bovino degradada (EBD). 60
4.4. Aplicación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en la excreta de bovino degradada (EBD). 62
4.4.1. Cinética de liberación de fósforo en presencia de ácidos orgánicos. 62
4.4.2. Liberación de Pi desde la EBD en presencia de distintas dosis de ácidos orgánicos. 67
4.4.3. Isotermas de adsorción de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada. 68
4.5. Disponibilidad de fósforo en un suelo de origen volcánico, enmendado con excreta de bovino degradada (EBD). 72
4.5.1. Efecto de la EBD sobre el pH del suelo. 72
4.5.2. Efecto de la EBD sobre el P disponible extraído en bicarbonato de sodio. 73
4.6. Estudio del fósforo y de los ácidos orgánicos en la rizósfera de *Lolium perenne*, utilizando un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD). 80
4.6.1. Producción de materia seca y captación de fósforo. 80
4.6.2. Variación del pH y de la concentración de aniones en la solución rizosférica. 82

5. CONCLUSIONES 88
6. PROYECCIONES 90
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 91
8. ANEXOS 102

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Compuestos orgánicos de fósforo (Raboy, 2003; Turner et al., 2005). 6

Figura 3.1. Esquema de las actividades experimentales realizadas. 20

Figura 3.2. Esquema del sistema utilizado para la degradación aerobia de la excreta de bovino. 22

Figura 3.3. Reactores utilizados para la degradación aerobia de la excreta de bovino. Implementación de los reactores en el laboratorio (a). Vista de los reactores en triplicado (b). Datalogger para la medición de la temperatura (c). Registrador de pH (d). 23

Figura 3.4. Tipo de rizotrón utilizado para evaluar la disponibilidad de P en la rizósfera de *Lolium perenne*. 35

Figura 3.5. Montaje de los rizotrones utilizados para evaluar la disponibilidad de P en la rizósfera de *Lolium perenne*. Rizotrón utilizado (a). Placa perforada frontal para el montaje de los rizones (b). Rizones para la succión de la solución rizosférica (c). Rizotrones instalados en la cámara de crecimiento (d). 37

Figura 4.1. Monitoreo de la temperatura (a) y del pH (b) durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino. 41

Figura 4.2. Dinámica del Pi extraído en agua, durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino. 43

Figura 4.3. Dinámica del P biomásico, durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino. 44

Figura 4.4. Dinámica de los iones de intercambio, Ca, Al y Fe, durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino. 46

Figura 4.5. Variación porcentual de Pi, Po y P-residual durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 47

Figura 4.6. Variación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina, durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 53

Figura 4.7. Espectros de ^{31}P resonancia magnética nuclear (RMN) de muestras de excreta de bovino, obtenidas durante el proceso de degradación aerobia. 56

Figura 4.8. Bacterias que utilizan fitato (BUF), aisladas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 60

Figura 4.9. Pi liberado desde la excreta de bovino degradada (EBD), en presencia de los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75. 61

Figura 4.10. Ácidos orgánicos utilizados para inducir la liberación de Pi desde la excreta de bovino degradada (EBD). 62

Figura 4.11. Cinética de liberación de Pi desde la excreta de bovino degradada (EBD), en presencia de ácidos orgánicos. 63

Figura 4.12. Incremento de liberación de Pi desde la EBD, con respecto a la EBD control, utilizando ácidos orgánicos (determinaciones realizadas a las16 h). 64

Figura 4.13. Isotermas de adsorción de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD), ácido cítrico (a) y ácido oxálico (b) 69

Figura 4.14. Isotermas de adsorción de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD), ácido málico (a) y ácido glucónico (b). 70

Figura 4.15. Variación del pH de un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD). 72

Figura 4.16. Dinámica de Pt disponible (extraído en bicarbonato de sodio) en un 74

suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

Figura 4.17. Dinámica de Pi disponible (extraído en bicarbonato de sodio) en un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD). 75

Figura 4.18. Dinámica de Po disponible (extraído en bicarbonato de sodio) en un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD). 76

Figura 4.19. Contenido de P biomásico en relación al P orgánico disponible (extraído con bicarbonato de sodio), en un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD). 78

Figura 4.20. Materia seca (a) y contenido de P (b) en plantas de *Lolium perenne* (cuantificados en un total de 6 plantas por rizotrón), utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta bovino degradada (EBD). 81

Figura 4.21. Variación del pH en la solución rizosférica de *Lolium perenne,* utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta bovino degradada (EBD). 82

Figura 4.22. Dinámica de fosfato en la solución rizosférica de *Lolium perenne*, utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD). 83

Figura 4.23. Dinámica de aniones orgánicos en la solución rizosférica de *Lolium perenne*, utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD), oxalato (a) y formiato (b). 85

86

Figura 4.24. Dinámica de aniones orgánicos en la solución rizosférica de *Lolium perenne*, utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD), citrato (a) y acetato (b)

INDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Caracterización de la excreta de bovino (en base a materia seca) recolectadas durante el periodo 2005-2006. 39

Tabla 4.2. Fraccionamiento secuencial de P, en muestras de excreta obtenidas durante el proceso de degradación aerobia. Pi, Po y P-residual (mg kg^{-1}) en las distintas fracciones de P. 51

Tabla 4.3. Recuento de bacterias mesófilas cultivables totales (BCT) y de bacterias que utilizan fitato (BUF), durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 57

Tabla 4.4. Identificación genética de las bacterias que utilizan fitato (BUF), aisladas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. 59

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Elovich, para describir la liberación de Pi desde la excreta de bovino degradada (EBD) en presencia de ácidos orgánicos. 63

Tabla 4.6. Cationes de la excreta de bovino degradada (EBD) que forman complejos con citrato, malato y oxalato. Porcentaje del catión en solución que forma complejos con los ligandos orgánicos (%). 66

Tabla 4.7. Liberación de Pi, desde la excreta de bovino degradada (EBD), en relación a la dosis de ácido orgánico aplicado. 68

Tabla 4.8. Coeficientes de la ecuación de Freundlich y de Langmuir para la adsorción de los ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD). 71

ABREVIACIONES

P total	**:**	Contenido de fósforo total de una muestra de excreta o de suelo.
P inorgánico	**:**	Contenido de fósforo inorgánico de una muestra de excreta o de suelo.
P orgánico	**:**	Contenido de fósforo orgánico de una muestra de excreta o de suelo.
EBD	**:**	Excreta de bovino degradada. Se refiere a la excreta de bovino que fue degradada aeróbicamente durante 105 días.
Pt	**:**	P total en un determinado extracto o fracción, proveniente de una muestra de excreta o de suelo.
Pi	**:**	P inorgánico en un determinado extracto o fracción, proveniente de una muestra de excreta o de suelo.
Po	**:**	P orgánico en un determinado extracto o fracción, proveniente de una muestra de excreta o de suelo.
MO	**:**	Materia orgánica.
AO	**:**	Ácidos orgánicos.
Pi-H_2O	**:**	Pi extraído en H_2O durante el fraccionamiento de P.
Po-H_2O	**:**	Po extraído en H_2O durante el fraccionamiento de P.
Pi- $NaHCO_3$	**:**	Pi extraído en $NaHCO_3$ durante el fraccionamiento de P.
Po- $NaHCO_3$	**:**	Po extraído en $NaHCO_3$ durante el fraccionamiento de P
Pi- NaOH	**:**	Pi extraído en NaOH durante el fraccionamiento de P.
Po-NaOH	**:**	Po extraído en NaOH durante el fraccionamiento de P.
Pi-HCl	**:**	Pi extraído en HCl durante el fraccionamiento de P.
Po-HCl	**:**	Po extraído en HCl durante el fraccionamiento de P.
P-Residual	**:**	P residual que no es posible de extraer durante el fraccionamiento de P.
BCT	**:**	Bacterias mesófilas cultivables totales.

BUF **:** Bacterias que utilizan fitato.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Antecedentes generales.

La generación de residuos relacionados con la producción animal ha aumentado progresivamente en los últimos años debido al incremento del número de planteles destinados a la producción bovina, porcina y avícola. Se ha estimado que el volumen de los residuos líquidos generados al año, en predios lecheros del sur de Chile; que consisten en la mezcla de excreta, orina, aguas de lavado y aguas lluvia; corresponden en promedio a 6780 m^3, con valores extremos entre 775 y 42790 m^3 (Salazar et al., 2003). En estos residuos, sobre el 90% del fósforo (P) es aportado por la excreta de bovino (Haynes y Williams, 1993; Baeza, 2002), la cual tiene contenidos de P total que varían entre 3,1 y 9,5 g kg^{-1} (Baeza, 2002; Dou et al., 2002; McDowell y Stewart, 2005; Toor et al., 2005).

En la excreta el P se encuentra tanto en forma orgánica como inorgánica. Dentro de la fracción de P orgánico, los compuestos de inositol fosfato son los más abundantes (Leinweber et al., 1997; McDowell y Stewart 2005; Toor et al., 2005). Estos compuestos son considerados recalcitrantes debido a su afinidad por la superficie de los coloides, lo cual disminuye las posibilidades de degradación y la posterior liberación de iones fosfato (Turner et al., 2003). En la fracción de P inorgánico, se encuentran los fosfatos de calcio, iones fosfato en solución y iones fosfato adsorbidos sobre la superficie órgano-mineral de la excreta (McDowell y Stewart, 2005; Fuentes et al., 2006; Toor et al., 2006).

Durante el proceso de degradación de los residuos orgánicos, los compuestos de P están expuestos a modificaciones que pueden originar fosfatos inorgánicos con distinto grado de solubilidad, y compuestos orgánicos estables que dificultan la mineralización del P orgánico (Traoré et al., 1999; Frossard et al., 2002). Por esta razón, la evaluación de la dinámica de P, durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino, es una herramienta útil para determinar los factores que influyen sobre la disponibilidad de P en el residuo y posteriormente en el suelo.

Los suelos derivados de materiales volcánicos son de gran importancia para la economía del Sur de Chile, debido a que sustentan la producción agrícola y ganadera de la zona. Estos suelos presentan alta capacidad de adsorción de P (Borie y Zunino, 1983; Borie et al., 1989; Borie y Rubio, 2003; Mora et al., 2002; Mora et al., 2006) y alta acumulación de P orgánico, principalmente como fitato (Borie y Zunino, 1983; Borie et al., 1989; Borie y Rubio, 2003). La combinación de ambos factores genera la baja disponibilidad de este macronutriente (Borie et al., 1989; Escudey et al., 2001; Redel et al., 2007).

De acuerdo a lo anterior, se hace necesario estudiar alternativas para aumentar la disponibilidad de P en los residuos orgánicos y en el suelo. En este contexto, la mineralización del P orgánico, por medio de bacterias que utilizan fitato, y la liberación de P inorgánico, por medio de ácidos orgánicos, se visualizan como herramientas factibles de utilizar en procesos biotecnológicos para incrementar la disponibilidad de P. Las estrategias anteriores, pueden constituir la base para implementar tecnologías efectivas que ayuden a resolver los problemas de deficiencia de P en suelos y disminuir así, la aplicación de fertilizantes fosfatados.

En los últimos años se ha incrementado el estudio respecto a las interacciones de P inorgánico y de P orgánico en suelos y suelos enmendados con residuos orgánicos, con el fin de proporcionar información que contribuya a la sustentabilidad del ciclo del P (Ebeling et al., 2002; Laboski y Lamb, 2003; Griffin et al., 2003; He et al., 2004a; Sharpley et al., 2004; Verma et al., 2005). Si bien, la incorporación de los residuos en el suelo puede aumentar la disponibilidad de P, esto dependerá de la capacidad que posea el propio residuo para reducir o promover la adsorción de P en el suelo, de la contribución de las distintas especies de P y del aporte microbiológico capaz de mineralizar los compuestos orgánicos con la posterior liberación de P disponible (Haynes y Mokolobate, 2001; Mokolobate y Haynes, 2002; Pypers et al., 2005). Además, el comportamiento de P en el suelo esta sujeto a las transformaciones originadas por los procesos de humificación de la materia orgánica, inmovilización y mineralización, reacciones de precipitación y de adsorción, que en conjunto condicionan el equilibrio de P en la solución del suelo. Sin embargo, estas interacciones se modifican en el sistema suelo-planta, debido a las condiciones especiales

que ocurren en la rizósfera (Hinsinger, 2001). Por lo tanto, estudios en el suelo y en la rizósfera son necesarios para conocer la influencia de los residuos orgánicos, específicamente de la excreta de bovino, sobre la disponibilidad de P y sobre la captación de P por las especies pratenses.

1.2. Hipótesis de trabajo.

La dinámica de fósforo varía en función de los procesos químicos y microbiológicos asociados a la degradación aerobia de los residuos orgánicos, en forma similar a los procesos que ocurren en suelos con alto contenido de materia orgánica. La incorporación de residuos orgánicos en el suelo, modifica la distribución de las distintas especies químicas de P. Se ha comprobado que la presencia de microorganismos, que liberan enzimas fosfatasas y ácidos orgánicos, favorecen la disponibilidad de P en el suelo. En base a estas consideraciones, se proponen las siguientes hipótesis:

1) Durante el proceso de degradación de la excreta de bovino es posible encontrar una etapa de máxima disponibilidad de P asociada a la mineralización del fósforo orgánico.

2) Durante el proceso de degradación de la excreta de bovino existen bacterias que degradan el fitato, aumentando la disponibilidad de P.

3) La incorporación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en la excreta de bovino degradada incrementa la disponibilidad de P.

4) La aplicación de excreta de bovino degradada en el suelo, incrementará la concentración de fósforo disponible disminuyendo la concentración de ácidos orgánicos en la rizósfera de *Lolium perenne*.

1.3. Objetivos.

Objetivo general.

Estudiar la distribución de las fracciones de fósforo en la excreta de bovino durante las distintas etapas de degradación aerobia. Además, determinar el aumento de P disponible debido a la aplicación de la excreta de bovino degradada en suelo y en la rizósfera de una especie pratense modelo.

Objetivos específicos.

1. Evaluar la dinámica de fósforo durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino en reactores, en condiciones controladas.

2. Identificar bacterias que utilizan fósforo orgánico, en las distintas etapas del proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino.

3. Evaluar el efecto de la adición de ácidos orgánicos de bajo peso molecular sobre la liberación de fósforo en la excreta de bovino degradada para determinar el P potencialmente disponible.

4. Evaluar la disponibilidad de fósforo en un suelo de origen volcánico, enmendado con excreta de bovino degradada.

5. Determinar el efecto de la aplicación de excreta de bovino degradada, sobre la disponibilidad de fósforo y sobre los ácidos orgánicos de la rizósfera de *Lolium perenne.*

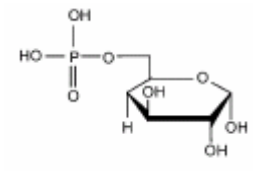
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1. Compuestos de fósforo en el medio ambiente.

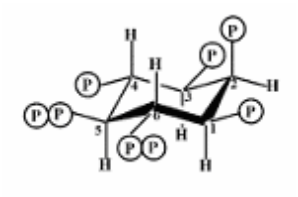
El fósforo es un elemento esencial para los seres vivos, debido a que forma parte de varias biomoléculas tales como ácidos nucleicos y fosfolípidos, y participa en diversas reacciones bioquímicas del metabolismo celular. En el suelo, el P proviene del material parental o puede ser introducido por medio de fertilizantes minerales o a través de residuos orgánicos, lo cual genera un aumento del P total (Scherer y Sharma, 2002; Verma et al., 2005).

Las plantas y los microorganismos captan el P en su forma inorgánica desde la solución del suelo, preferentemente como $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}. Los compuestos orgánicos de P son derivados de residuos microbianos, vegetales y animales; éstos pueden ser mineralizados por la biomasa microbiana o estabilizados en la matriz del suelo (Oehl et al., 2004). En suelos con alta capacidad de fijación de P, la concentración de P orgánico varía entre 654 y 1942 mg kg^{-1}, lo cual corresponde a 49 y 64% del P total del suelo (Borie et al., 1989). En suelos con bajos niveles de P disponible, el proceso de mineralización del P orgánico permite que éste sea una fuente importante de P para los microorganismos y para las plantas (Thien y Myers, 1992; Haygarth y Jarvis, 1997; Makarov et al., 2005; Parfitt et al., 2005). Los compuestos de P orgánico con mayor relevancia en el reciclaje de P son las especies monoéster fosfato y las especies diéster fosfato (Figura 2.1).

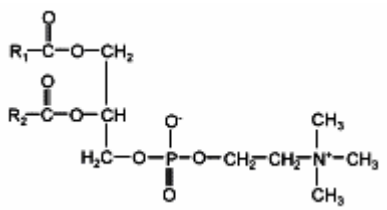
En los compuestos monoéster fosfato, el P está unido a un átomo de oxígeno (de la forma P-O-C). Algunas estructuras que presentan este tipo de enlace son el *myo*-inositol-hexa*kis*fosfato, glucosa-6-fosfato, ρ-nitrofenil-fosfato, nucleótidos de ADN y de ARN. Los compuestos de inositol fosfato han sido identificados en suelos, en aguas residuales, en lixiviados y en residuos orgánicos (Turner et al., 2002b; Turner y McKelvie 2002; Andlid et al., 2004).



Glucosa 6- fosfato



Inositol fosfato



L-α-fosfatidil- colina (lecitina)

Figura 2.1. Compuestos orgánicos de fósforo (Raboy, 2003; Turner et al., 2005).

En los compuestos de inositol fosfato, el número de grupos fosfato presentes en el anillo de inositol puede variar entre uno a seis, lo que favorece tanto la interacción con cationes monovalentes y polivalentes, como la formación de enlaces inter o intra moleculares, resultando en la formación de compuestos poliméricos (Dao, 2003). En general, los compuestos de inositol fosfato son fuertemente adsorbidos en el suelo y la intensidad de la interacción va a depender de la densidad de carga negativa de los diferentes compuestos. La adsorción de inositol fosfato en el suelo ocurre a través de los grupos fosfato, mediante la formación de enlaces mono, bi y multi dentados (Celi et al., 2001), con los constituyentes orgánicos e inorgánicos del suelo. Borie et al. (1989) informaron que entre el 42 y el 67% del P orgánico en suelos volcánicos, corresponde a compuestos de inositol penta y hexa fosfato, los cuales forman fuertes asociaciones con los ácidos húmicos y fúlvicos. Aunque los compuestos de inositol fosfato son dominantes en muchos suelos, es probable que otros compuestos monoéster fosfato sean más importantes en términos de ciclado y de disponibilidad de P a corto plazo (Zhang et al., 1999; Turner y McKelvie, 2002). Esto se debe a la alta capacidad de estabilización en el suelo y a su baja solubilidad (Turner et al., 2002a; Turner et al., 2002b; Briceño et al., 2004; Mc Dowell y Stewart, 2006), lo cual dificulta la degradación microbiológica y limita la liberación de P disponible (Yadav y Tarafdar, 2003; Briceño et al., 2004; Hansen, et al., 2004).

En los compuestos diéster fosfato, el grupo fosfato esta enlazado a dos átomos de oxígeno (C-O-P-O-C). Este tipo de enlace está presente en los ácidos nucleicos, nucleótidos y algunas proteínas. Este grupo puede ser una importante fuente de P disponible, puesto que posee una baja densidad de carga negativa, lo que disminuye la interacción iónica con los

constituyentes del suelo, quedando más expuestos a la degradación enzimática en comparación con los compuestos monoéster fosfato (Taranto et al., 2000; McDowell y Stewart, 2006). Por lo tanto, los compuestos diéster fosfato tienen un rol importante en el ciclado de P en los ecosistemas (Makarov et al., 2002). Borie y Rubio (2003) indican que los ácidos nucleicos y los fosfolípidos son mayoritariamente de origen microbiano y se encuentran en menor cantidad que las especies monoéster fosfato. En suelos agrícolas, los bajos niveles podrían indicar que estos compuestos son sustratos de ciclado rápido; por lo tanto, pueden representar un importante intermediario entre la nutrición microbiana y las plantas.

2.2. Factores que afectan la disponibilidad de fósforo en el suelo.

Comparado con otros nutrientes, el P presenta una menor disponibilidad para las plantas, lo cual lo convierte en un factor limitante para la producción agrícola. Esta baja disponibilidad se relaciona con la elevada reactividad que tiene el anión fosfato con los diversos constituyentes del suelo y de la rizósfera (Borie y Zunino, 1983; Hinsinger, 2001). Las interacciones del fosfato con los sitios activos de la superficie de los minerales del suelo (óxidos de Fe, Al y minerales de silicato) están asociadas a la formación de enlaces mono y bidentados, que corresponden a compuestos lábiles y estables de P, respectivamente (Mora y Canales, 1995a; Mora y Canales, 1995b; Nwoke et al., 2003). En suelos de carga variable, los aniones fosfato son adsorbidos específicamente, y forman complejos de esfera interna a través de enlaces coordinados por reemplazo de grupos –OH y $–OH_2$ superficiales (Goldberg y Sposito, 1984). En suelos ácidos, la mineralogía y las condiciones fisicoquímicas favorecen la adsorción de P. Por lo tanto, en estos suelos, aunque el nivel de P total sea alto, se presentan bajos niveles de P disponible (Iyamuremye et al., 1996a; Hinsinger, 2001). El pH ácido del suelo contribuye a incrementar la concentración de Al^{3+}, Fe^{3+} y Mn^{2+} intercambiable; estos cationes pueden reaccionar fácilmente con fosfato provocando la precipitación y disminuyendo así su disponibilidad (Tan, 1993; Iyamuremye et al., 1996a; Iyamuremye et al., 1996b; Haynes y Mokolobate, 2001; De Brouwere et al., 2003). El incremento del pH del suelo causa la precipitación de Al y de Fe intercambiable, lo cual reduce el potencial de precipitación de los compuestos P-Al y P-Fe (Iyamuremye et

al., 1996a). En los suelos alcalinos también ocurren reacciones de fijación de P, las que se producen debido a la alta cantidad de iones Ca^{2+} que reaccionan con fosfato para formar precipitados de calcio (De Brouwere et al., 2003; Nwoke et al., 2003).

El pH de la solución del suelo afecta la distribución de las especies de P, y también afecta la carga superficial del suelo. La distribución de las especies de P se debe a la disociación de los protones del ácido fosfórico, de los polifosfatos y de los fosfatos orgánicos; lo cual está relacionado con el valor de las constantes de ionización ácida (pKa). En el rango de pH del suelo, las especies predominantes provenientes del ácido fosfórico son $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-} (Tan, 1993). En el rango de pH 5,5 - 7,0 se presenta la mayor disponibilidad del P para las plantas. Desde los compuestos orgánicos de P también se disocian protones, dependiendo del pH de la solución del suelo; por ejemplo, el *myo*-inositol hexa*kis*fosfato tiene valores de pKa entre 1,8 y 9,7 (Cosgrove, 1980). Este compuesto tendría a lo menos 6 protones disociados en el rango de pH normal del suelo, otorgándole una alta densidad de carga negativa a la molécula, lo que le permite interaccionar con los constituyentes del suelo.

Por otra parte, los iones H^+ y OH^- modifican la carga superficial y son responsables del potencial eléctrico de la superficie de los coloides del suelo de carga variable. Esta característica se refleja en el punto de carga cero (PCC); valor de pH donde la superficie tiene igual cantidad de cargas positivas y negativas, resultando con carga neta igual a cero. A valores de pH bajo el PCC, la superficie presenta predominio de cargas positivas y a valores de pH sobre el PCC, la carga superficial es predominantemente negativa (Hyun y Lee, 2004). Por lo tanto, a valores de pH menores que el PCC se verá favorecida la adsorción de aniones debido a la protonación de las especies superficiales dependientes del pH, lo que genera atracción electrostática entre los aniones fosfato y los compuestos cargados positivamente de la superficie (Xu et al., 2003).

La materia orgánica (MO) del suelo mantiene las condiciones físicas, químicas y biológicas que permiten el desarrollo de los microorganismos. Además; cumple la función de soporte para el intercambio de los nutrientes, mejorando la fertilidad del suelo. La capacidad de intercambio iónico de los constituyentes de la MO del suelo es atribuida a los protones

disociables de los grupos fenólicos, hidroxilos y carboxilos presentes en los compuestos aromáticos y alifáticos (Tan, 1993). Esta característica genera capacidad buffer en un amplio rango de pH, lo cual es importante en los procesos de entrega de nutrientes a los cultivos (García-Gill et al., 2004). La adsorción de la MO sobre los componentes del suelo ocurre por medio de intercambio de ligandos con los grupos hidroxilos de la superficie, originando compuestos Fe-MO y Al-MO que influyen en el comportamiento del suelo en cuanto a su reactividad (Tan, 1993; Mora y Canales, 1995a, Mora y Canales, 1995b). Esto le permite adquirir un rol fundamental en la regulación del transporte y en la disponibilidad de nutrientes en la solución del suelo. Como las moléculas húmicas se adsorben por el mismo mecanismo que los iones fosfato, puede existir un efecto competitivo entre ambas moléculas por los sitios activos superficiales, provocando así una disminución de la adsorción de fosfato. Esto da como resultado complejos órgano-metálicos coordinados, muy estables, que no son desplazados por la molécula de fosfato (Mora and Canales, 1995a; Mora y Canales, 1995b; Haynes y Mokolobate, 2001). Mora y Canales (1995b) investigaron el rol de la MO sobre la adsorción de fosfato en Andisoles de Chile. Los resultados encontrados indican que cuando se extrae la MO del suelo, aumenta la adsorción de fosfato debido al incremento del área superficial originada por el gran contenido de materiales alofánicos, y por el aumento del número de sitios activos presentes en la matriz inorgánica del suelo. Por otra parte, algunos investigadores postulan que la presencia de MO genera nuevos sitios activos que favorecen la adsorción de P (De Brouwere et al., 2003). Las correlaciones entre el contenido de C orgánico y P orgánico, encontradas en suelos de origen volcánico, fundamentan las interacciones entre la MO y el P (Borie et al., 1989; Escudey et al., 2001; Borie y Rubio 2003; Briceño et al., 2004). Lo anterior ilustra el rol que cumple la MO en la retención de P mediante la formación de complejos estables de P-MO; lo cual disminuye la disponibilidad de P para las plantas (Borie and Zunino, 1983). En este contexto, Borie et al., (1989) y Borie y Rubio (2003) indicaron que el P, en suelos ácidos del sur de Chile, se encuentra asociado con macromoléculas orgánicas, las cuales representan altas proporciones del P total (entre 49 y 64%). Esto sugiere que el P orgánico varía con el contenido de materia orgánica, encontrando entre 51 y 68% del P orgánico asociado a ácidos húmicos y, entre 32 y 49% asociado a los ácidos fúlvicos. Escudey et al.,

(2001) determinaron que, en suelos volcánicos del sur de Chile, existe un alto contenido de P orgánico que se encuentra asociado principalmente a las fracciones húmicas del suelo.

2.3. El fósforo en los residuos orgánicos y su incorporación en el suelo.

En los suelos se utilizan diversos residuos orgánicos como complemento de fertilizantes minerales (Mora et al., 1995), que pueden ser de origen agrícola, ganadero, industrial o doméstico; los cuales pueden ser incorporados en forma fresca o estabilizada. Si el P proveniente de los residuos orgánicos no es reciclado eficientemente en el sistema suelo - planta - animal, se puede producir un uso ineficiente de este macronutriente, debido a su acumulación en los suelos como especie de baja disponibilidad. Por otra parte, se puede generar la pérdida de P por lixiviación o por escurrimiento, causando problemas de contaminación asociado a la eutroficación de cuerpos de agua.

La distribución de P en purines y en excretas varía en relación a la especie animal, a la dieta y a las condiciones de almacenamiento (Leinweber et al. 1997; Ajiboye et al., 2004; Hansen et al. 2004). En purines de bovino, se han determinado contenidos de P total entre 4,1 y 18,3 g kg^{-1}, y se ha estimado que, entre el 60 y el 70% del P total estaría formando compuestos inorgánicos de P (He et al., 2004a). Estos últimos incluyen fosfatos, polifosfatos y precipitados de Fe, Ca, Al y Mg, los cuales pueden presentar baja disponibilidad (He et al., 2003a; Hansen et al., 2004). Por otra parte, se ha estimado que los compuestos orgánicos de P pueden llegar a constituir el 40% del P total (Hansen et al., 2004). Algunos investigadores han indicado que dentro de los compuestos de P orgánico presentes en purines, las formas monoéster fosfato son predominantes, y dentro de éstos, se ha encontrado mayoritariamente el fitato, que corresponde a la sal del ácido fítico (Hansen et al., 2004; He et al., 2004a). Barnett (1994) determinó que el P orgánico, en purines de animales, puede alcanzar sobre el 50% del P total. Por lo tanto, la hidrólisis de P orgánico podría incrementar la disponibilidad de P en los residuos y posteriormente en el suelo (He et al., 2003a).

En suelos enmendados con residuos orgánicos, los mecanismos que incrementan la disponibilidad de P son interdependientes y simultáneos e incluyen: la incorporación de P, el aumento del pH, la solubilización de fosfatos, la producción y liberación de aniones orgánicos, el aumento de la actividad fosfatasa, la incorporación de sustancias húmicas y la complejación de iones intercambiables Al, Fe, Mn y Ca (Kwabiah et al., 2003). Se ha informado que la incorporación de purines en el suelo, aumenta inicialmente la disponibilidad de P, y luego decrece con el tiempo (Scherer y Sharma, 2002; Baeza, 2002), lo cual se debe a los cambios en los patrones de la distribución de Pi y Po presentes en las diferentes fracciones del suelo (Hansen et al., 2004). Laboski y Lamb (2003) observaron que la aplicación de purines en un suelo, genera mayor disponibilidad de P que la aplicación de fertilizante mineral. Este comportamiento fue atribuido a que los distintos materiales orgánicos generados durante el proceso de descomposición de los purines, son adsorbidos sobre la matriz del suelo, contribuyendo a la liberación de P y a la obstrucción de los sitios de adsorción. Scherer y Sharma (2002) indicaron que la aplicación de purines puede incrementar la disponibilidad de P en suelos, debido a que los aniones orgánicos liberados durante la degradación microbiana de la materia orgánica, producen el bloqueo de los sitios de adsorción de P y producen un efecto quelante de los iones Fe y Al.

2.4. El fósforo durante el proceso de degradación aerobia de los residuos orgánicos.

La degradación aerobia de los residuos orgánicos es una técnica muy utilizada, debido a que es de bajo costo, permite la fácil aplicación de los materiales degradados, permite la eliminación de olores molestos y genera un material libre de patógenos. Durante la degradación de los residuos orgánicos, los compuestos de P pueden sufrir transformaciones asociadas a los procesos de mineralización – inmovilización de nutrientes, a la humificación de la MO y a las condiciones fisicoquímicas del medio (Traoré et al., 1999; Frossard et al., 2002). Sin embargo, el efecto de la degradación de la MO sobre la dinámica de P es poco claro (Adler y Sikora, 2003). Adler y Sikora (2003) investigaron el efecto de la edad del compost sobre los niveles de P en el suelo, indicando que el compost inmaduro y biológicamente activo, puede adicionar P soluble al suelo, disolver fosfatos, desplazar P adsorbido y/o reducir la capacidad de adsorción; por lo tanto, puede incrementar la

concentración de P en solución. Sin embargo, la aplicación de compost inmaduro también puede generar impactos negativos en el suelo, como por ejemplo, inhibir la germinación de semillas, provocar la destrucción de las raíces y suprimir temporalmente el crecimiento de las plantas (Smith y Hughes, 2004).

2.5. Técnicas utilizadas para el estudio del fósforo en los residuos orgánicos.

2.5.1. Fraccionamiento secuencial de fósforo.

La técnica de fraccionamiento secuencial de P fue desarrollada por Hedley et al., (1982) para el estudio de la disponibilidad del P en suelos. Las fracciones de P se clasifican en:

- Fracciones lábiles, que incluyen el P extraído en H_2O (Pi y Po soluble) y el P extraído en $NaHCO_3$ (Pi y Po débilmente unido a la superficie de los minerales del suelo).
- Fracciones de menor labilidad, que incluyen el P extraído en NaOH (Pi y Po unido fuertemente a componentes de Al y Fe provenientes de la superficie de los minerales del suelo) y el P extraído en HCl (Pi unido principalmente a compuestos de calcio).
- Fracción recalcitrante que corresponde a P residual, el cual incluye formas químicamente estables de Po y formas relativamente insolubles de Pi.

El fraccionamiento secuencial de P ha sido ampliamente utilizado para caracterizar el P en los residuos orgánicos (Leinweber et al., 1997; Traoré et al., 1999; Frossard et al., 2002; He et al., 2003b; Ajiboye et al., 2004; McDowell and Stewart, 2005; Toor et al., 2006). Esta técnica en una herramienta útil, que permitiría conocer los cambios en los patrones de distribución de P, que se generan durante el proceso de degradación aerobia de los residuos orgánicos.

2.5.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).

El análisis de ^{31}P RMN ha sido ampliamente utilizado para el estudio del P en muestras de suelos, purines, excretas y suelos enmendados con purines y excretas, puesto que provee

información respecto de las especies de P existentes (Turner et al., 2003, Briceño et al., 2004; Turner, 2004, Cade-Menun, 2005, McDowell y Stewart, 2005; Toor et al., 2005; Bol et al., 2006). Con esta técnica se han logrado importantes avances en el estudio de compuestos inorgánicos y de estructuras orgánicas, tales como: proteínas, compuestos de inositol fosfato, ácidos nucleicos y fosfonatos. Esta técnica puede ser aplicada con fines medioambientales y agronómicos, para conocer las variaciones de los compuestos de Po y Pi.

Actualmente para la extracción de P, desde residuos orgánicos, se utiliza NaOH-EDTA debido a que se logra una elevada recuperación del Po y se evitan las interferencias provocadas por los iones paramagnéticos, tales como Fe y Mn. La identificación de las señales de los distintos compuestos de P, se encuentran bien documentadas tanto para suelos como para purines y excretas (Turner et al., 2003; Turner, 2004; Cade-Menun, 2005; McDowell y Stewart 2005; Toor et al. 2005).

2.6. Relación de los ácidos orgánicos y de las enzimas fosfatasas con la disponibilidad de fósforo.

2.6.1. Ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos (AO) de bajo peso molecular, son exudados por plantas y por microorganismos, y pueden ser originados por la degradación de moléculas orgánicas complejas (Jones, 1998; Geelhoed et al., 1999; Jones et al., 2003; Yadav and Tarafdar, 2003). Estos ácidos se encuentran preferentemente en la rizósfera donde tienen una duración transitoria, puesto que son una fuente lábil de carbono y pueden ser degradados por los microorganismos, no obstante su generación y su liberación son continuas en el tiempo, asegurando su presencia en la rizósfera (Geelhoed et al., 1999; Jones et al., 2003; Xu et al., 2003). Los AO también han sido detectados durante la degradación de residuos orgánicos, por ejemplo Singh y Amberger (1997) informaron la presencia de los ácidos glicólico, oxaloacético, succínico, fumárico, málico, tartárico y cítrico, durante compostaje de residuos orgánicos.

Se ha sugerido que los AO tienen un rol fundamental en la captación de nutrientes por las plantas, por ejemplo, bajo condiciones de deficiencia de P, se ha observado un aumento de la cantidad de AO en los exudados de raíces de lupino blanco, raps, maíz y poroto (Jones, 1998; Ström et al., 2002; Jones et al., 2003). Además, se ha informado que las raíces de las plantas exudan principalmente ácido cítrico, málico y oxálico para solubilizar P. En tanto que, en algunas bacterias se ha correlacionado la producción de ácido glucónico con la solubilización de fosfatos insolubles (Kim et al. 1997; Pérez et al. 2007). Por otra parte, los AO también participan en el sistema de desintoxicación de las plantas. Se ha comprobado que las raíces expuestas a niveles tóxicos de Al^{+3} exudan mayor cantidad de AO, los que pueden formar complejos con los iones Al en solución, disminuyendo así su disponibilidad (Jones, 1998).

Los AO han sido utilizados para liberar P desde fertilizantes minerales y desde compuestos de P con distinto grado de solubilidad (Ström et al., 2002; Shen et al., 2002; Kpomblekou-A y Tabatabai, 2003). La capacidad de los AO para incrementar la disponibilidad de P en suelos, se debe a que éstos compiten por los sitios de adsorción con el anión fosfato y disuelven compuestos insolubles, tales como fosfatos de Ca, Fe y Al (Geelhoed et al., 1999; Jones et al., 2003). Estos procesos son dependientes del pH de la solución, del tipo de ácido y de la mineralogía del suelo (Bolan et al., 1994). El número de grupos carboxilos de los AO tiene relación con la liberación de P. Jones et al., (2003) comprobaron que los ácidos monovalentes se adsorben débilmente en la superficie del suelo, mientras que los AO divalentes se adsorben con mayor fuerza y los aniones trivalentes interaccionan fuertemente con la superficie, en un grado similar a fosfato. Bolan et al., (1994) indicaron que los AO incrementan la disponibilidad de P en suelos en el siguiente orden: ácidos tricarboxílicos > dicarboxílicos > monocarboxílicos. Jones (1998) explicó dos mecanismos, que probablemente ocurren en forma simultánea, para la liberación de P en presencia de AO: 1) intercambio de ligandos donde los aniones orgánicos reemplazan directamente a los grupos fosfatos o bien, intercambio de ligandos con grupos $Al(OH)_3$ y $Fe(OH)_3$ superficiales y 2) formación de complejos mono y bidentados con iones metálicos (Al^{3+} y Fe^{3+}) de la superficie del suelo, lo cual disminuye los sitios activos para la retención de P.

2.6.2. Enzimas fosfatasas.

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos específicos de innumerables reacciones, por lo que tienen gran valor ecológico, agronómico e industrial. Las enzimas son liberadas al suelo por los microorganismos y por las plantas, y son fundamentales en la formación y en la degradación de diversas moléculas, participando así en el ciclado de nutrientes, principalmente en el ciclo del C, del P, del N y del S (Pascual et al., 2002). En el suelo, la actividad enzimática tiene relación con el manejo agronómico y con la incorporación de residuos orgánicos (Deng y Tabatabai, 1997).

Existen distintos grupos de enzimas que catalizan la liberación de P por medio de la hidrólisis de enlaces éster y anhídridos. Estas enzimas tienen un rol fundamental en la liberación de P desde compuestos orgánicos (Shand y Smith, 1997; Thien y Myers, 1992). Algunas enzimas fosfatasas son:

- Fitasas (myo-inositol-hexakisfosfato hidrolasa): enzimas que liberan P desde el compuesto myo-inositol-hexakisfosfato (Pandey et al., 2001).
- Fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina: enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces monoéster fosfato (Deng y Tabatabai, 1997; Pant y Warman, 2000; Turner et al., 2002a)
- Fosfolipasa (fosfatidilcolina hidrolasa) y nucleasa: enzimas que hidrolizan compuestos diéster fosfato (Deng y Tabatabai, 1997; Pant y Warman, 2000; Turner et al., 2002a).
- Pirofosfatasa inorgánica: enzima hidrolasa que actúa sobre enlaces anhídridos que contienen fosfato (Deng y Tabatabai, 1997).

El aumento de la secreción de enzimas fosfatasas, tanto por plantas como por los microorganismos, ha sido relacionado con condiciones de estrés, originadas por la limitación de P. Se ha encontrado una mayor actividad fosfatasa en exudados de raíces que se encuentran en condiciones limitantes de P disponible. Yadav y Tarafdar (2001) estudiaron la relación existente entre la actividad fosfatasa ácida y las condiciones de deficiencia de P en la solución del suelo. Para ello utilizaron algunos compuestos orgánicos de P, tales como fitina (sal de inositol fosfato que representa una fuente de P no lábil), lecitina y glicerolfosfato y bajos niveles de fosfato en el suelo. Los resultados mostraron

que la máxima actividad de la enzima se produjo bajo condiciones limitantes de fosfato y en tratamientos con fitina. Tarafdar y Claassen (2003) demostraron que cuando la concentración de P orgánico decrece (lo cual aumenta en la concentración de fosfato en la solución del suelo), la concentración de fosfatasa ácida en exudados radicales disminuye.

Las enzimas fosfatasas presentes en el suelo son enzimas extracelulares y por lo general no se encuentran libres, sino que están asociadas con los constituyentes del suelo (Rao et al., 2000). La actividad de estas enzimas puede ser afectada por las condiciones de pH y de temperatura; por la presencia o la ausencia de inhibidores; por la fijación en los componentes del suelo a través de los procesos de adsorción, atrapamiento o polimerización. El conjunto de estos factores y procesos, contribuye a aumentar o disminuir la actividad enzimática. Por otra parte, el suelo puede ser un ambiente inhóspito para las enzimas extracelulares, debido a que éstas pueden sufrir la desnaturalización biológica o fisicoquímica, produciéndose la inactivación parcial o absoluta de la actividad enzimática (Pascual et al., 2002).

2.7. Los microorganismos y la disponibilidad de fósforo.

En la actualidad existe un interés creciente por estudiar los microorganismos involucrados en el reciclaje de nutrientes, con la finalidad de mejorar la fertilidad del suelo y la nutrición vegetal y animal (Igual et al., 2001; Konietzny y Greiner, 2004; Jorquera et al., 2008a; Jorquera et al., 2008b). La alta capacidad de adsorción de P que tienen los suelos, produce la acumulación de fosfatos orgánicos e inorgánicos de baja disponibilidad. Por esta razón, la presencia de microorganismos especializados en la solubilización o mineralización de fosfatos es fundamental para aumentar su captación por las plantas. Más aún, la eficiencia que muestran algunas especies vegetales para captar el P, estaría relacionada con la capacidad potencial para mantener y aumentar las interacciones con los microorganismos solubilizadores de P (Chen et al., 2008; Oliveira et al., 2008). Borie et al., (1998) observaron que la asociación entre las raíces de plantas de trigo y los hongos de las micorrizas arbusculares es un mecanismo que permite incrementar la captación de P, en cultivos establecidos en Andisoles del sur de Chile.

Con fines agronómicos, medioambientales y biotecnológicos, se han aislado microorganismos solubilizadores de P provenientes de diferentes ambientes, tales como: suelos, suelos deficientes de P, rizósfera de maíz y de especies pratenses, rizósfera de plantas con elevada captación de P, lagos y compost (Oliveira et al., 2008; Gen-Fu y Xue-Ping, 2005; Pérez et al., 2007; Chen et al., 2008, Jorquera et al., 2008b). Para el aislamiento de hongos y de bacterias solubilizadoras de P, se han utilizado medios de cultivo con diferentes fuentes de P, tanto inorgánicas (fosfato tricálcico y fosfato de aluminio) como orgánicas (fitato de sodio y lecitina) (Oliveira et al., 2008). Se ha reportado que las bacterias *Bacillus sp*, *Burkholderia sp, Serratia, Ralstonia, Rahnella aquatilis* y *Pantoea* tienen eficiente capacidad para solubilizar P desde fosfatos de Ca e hidroxiapatita (Kim et al., 1997; Pérez et al., 2007; Oliveira et al., 2008). Chung et al., (2005) informaron que las bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Pantoea* y *Klebsiella* son eficientes para solubilizar P desde fosfatos insolubles ($Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$ y $FePO_4$). Por otra parte, los estudios realizados por Oliveira et al., (2008) demostraron que poblaciones de los hongos *Aspergillu*s, *A. terreus* y *Talaromyces* son eficientes para solubilizar fosfato de aluminio, fitato y lecitina.

El uso de la enzima fitasa para la liberación de P, desde el fitato, puede ser una alternativa para incrementar la disponibilidad de P y disminuir la acumulación de este compuesto en el suelo. Los géneros bacterianos, tales como *Enterobacter* (aislado desde la rizósfera de plantas leguminosas, Yoon et al., 1996), *Pseudomona* (aislado desde suelos de Australia, Richardson y Hadobas, 1997) y *Burkholderia (*aislado desde la rizósfera de lupino blanco, Unno et al., 2005) han demostrado capacidad para mineralizar fitato. Jorquera et al., (2008a) informaron la capacidad dual que poseen las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Pantoea* para liberar P desde fosfatos de calcio y desde fitato. Adicionalmente, Jorquera et al., (2008b) demostraron que las bacterias mineralizadoras de fitato y las bacterias solubilizadoras de fosfato de calcio, aisladas desde la rizósfera de especies pratenses, incrementan la liberación de Pi en medio de cultivo. Pese a estos estudios, la mineralización de fitato es el proceso que se encuentra menos documentado; en este contexto, el conocimiento sobre los mecanismos y los factores que regulan la actividad fitasa en los microorganismos, puede ser una herramienta útil para

resolver problemas relacionados con la fertilidad del suelo, con el desarrollo de biofertilizantes, con la nutrición animal y con la formulación de alimentos.

2.8. Estudios de fósforo en la rizósfera.

La rizósfera es el volumen de suelo que tiene contacto con las raíces. Esta zona se distingue del seno del suelo, porque existe una elevada actividad microbiana, que es sostenida por el consumo de carbono lábil exudado por las raíces (Hinsinger, 2001), y porque en ella se genera un agotamiento de macro y micro nutrientes. Se ha señalado que los análisis químicos, referentes a la disponibilidad de nutrientes, realizados en el seno del suelo, no representan una aproximación verdadera de los fenómenos que ocurren en la interfase de la solución suelo - raíz (Rengel y Marschner, 2005). La disponibilidad de los nutrientes en la rizósfera esta controlada por el efecto combinado de las propiedades del suelo, las características de las distintas especies vegetales y las interacciones raíz - microorganismos (Wang et al., 2004; Rengel y Marschner, 2005). Los exudados radicales alteran la composición de la rizósfera, en función de las transformaciones que ocurren a través de la mineralización de las sustancias orgánicas, la inmovilización de los nutrientes y la liberación de componentes orgánicos. En la zona rizosférica se han detectado cantidades variables de ácidos orgánicos, con concentraciones que varían entre 10^{-3} y 10^{-5} M (Kpomblekou-A y Tabatabai, 2003). Algunos ácidos orgánicos encontrados en esta zona, incluyen al ácido cítrico, oxálico, málico, isocitrato y tartrato, entre otros (Jones, 1998).

La deficiencia de P en las plantas se genera cuando existe una captación menor que la necesaria para los procesos metabólicos. Esta situación puede ser el resultado de los siguientes fenómenos: bajo contenido de P en el suelo, baja solubilidad y baja disponibilidad de los compuestos de P. Las especies vegetales tienen distintos mecanismos para incrementar la captación de P, algunas estrategias incluyen: alteraciones en la superficie de contacto de las raíces, diferente composición de los exudados radicales y asociación con microorganismos de la rizósfera (Borie et al., 1998; Rengel y Marschner, 2005). Los cambios de pH, en la zona de la rizósfera, pueden inducir variaciones en la

concentración de P; así por ejemplo, se ha reportado que la liberación de protones al medio puede tener un efecto sobre la disolución de fosfatos de calcio (Shu et al., 2007).

La captación de P, por las raíces de las plantas, genera una disminución de la concentración de P en la solución de la rizósfera, provocando un gradiente de agotamiento hacia la raíz. Wang et al., (2004) determinaron concentraciones promedio de P de 0,81; 0,90 y 0,72 mg L^{-1} en la rizósfera de maíz, soja y algodón, respectivamente. Además, observaron que la gradiente de decrecimiento de la concentración de P desde la solución del suelo hacia la rizósfera, depende de la especie vegetal y es en función del tiempo y de la distancia desde la raíz.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objeto de facilitar la comprensión de las actividades desarrolladas en este estudio y su secuencia, se presenta un esquema en la Figura 3.1.

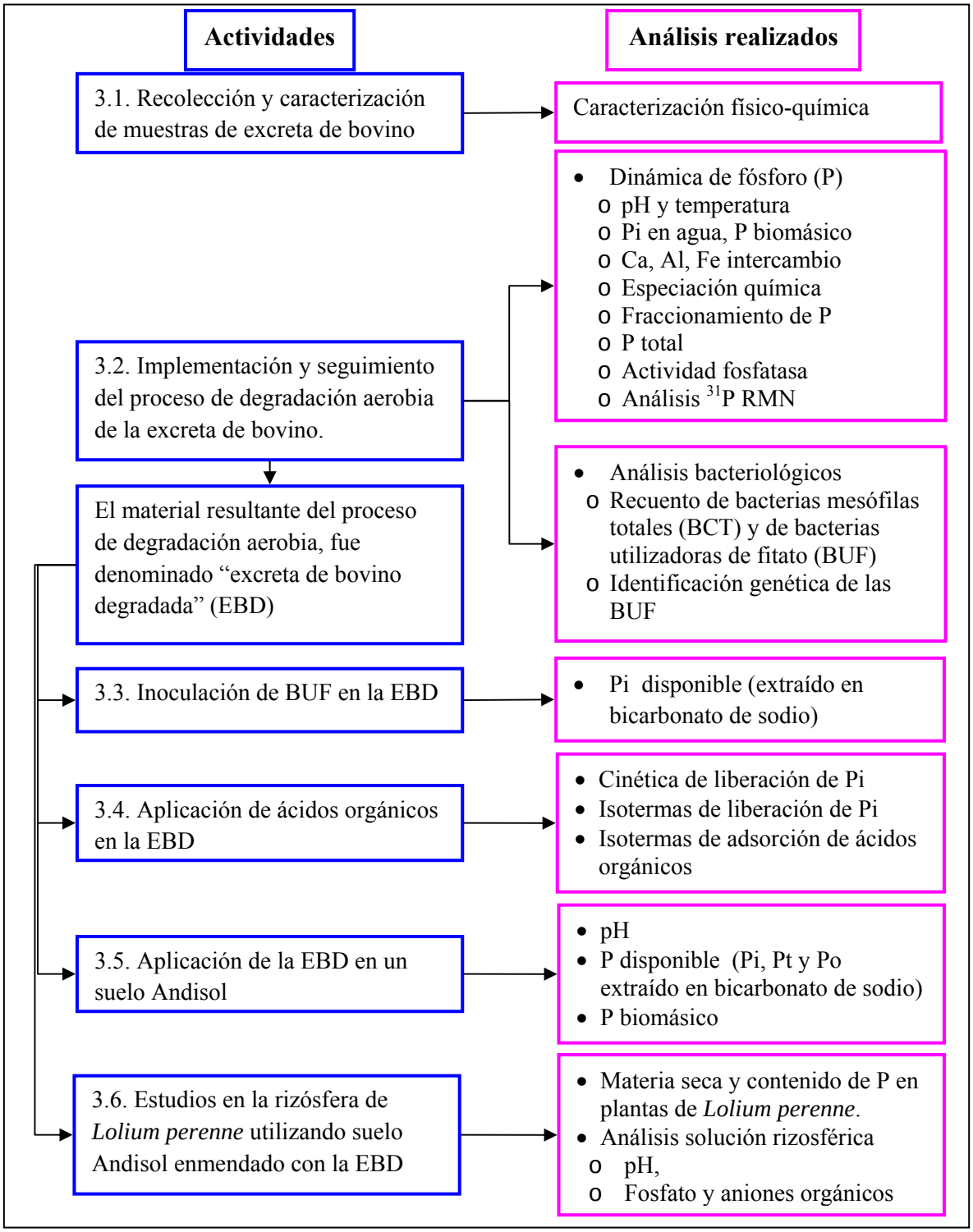


Figura 3.1. Esquema de las actividades experimentales realizadas.

3.1. Recolección y caracterización de la excreta de bovino.

3.1.1. Recolección de la excreta de bovino.

Las muestras de excreta de bovino fueron recolectadas en el plantel lechero ubicado en la Estación Experimental Maquehue, propiedad de la Universidad de La Frontera, durante el periodo 2005-2006. La alimentación del ganado bovino consistía en pastoreo regular, ensilaje y concentrado de avena; la pradera estaba constituida por trébol blanco (*Trifolium repens*) y ballica (*Lolium perenne*) y el suelo de ese predio recibía, anualmente, la aplicación de fosfato diamónico, urea, KCl y $CaSO_4$.

3.1.2. Análisis de elementos totales.

La excreta de bovino fue recolectada en bolsas plásticas evitando el contacto con la orina y con el suelo. Una vez obtenidas las muestras, éstas fueron homogenizadas y se procedió a la determinación del pH en agua destilada, utilizando muestra fresca en relación 1:10. La excreta de bovino fue secada a 70 °C durante 72 h, y fue molida antes de proceder al análisis de los elementos totales: Ca, Mg, Na, K, Cu, Zn, Fe, Mn, S, P y Al de acuerdo a la metodología descrita por Sadzawka et al., (2004a). La materia orgánica y el C total fueron determinados por calcinación a 550°C, según la metodología descrita en Sadzawka et al., (2005). El nitrógeno total se determinó por digestión Kjeldahl, destilación de NH_3 y titulación con H_2SO_4 0,05 N (Sadzawka et al., 2005). El contenido de fibra, (fibra detergente neutro, FDN), fue determinado según la metodología propuesta por Goering y Van Soest (1972).

3.2. Implementación y seguimiento del proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino.

3.2.1. Recolección de la excreta de bovino.

La excreta de bovino, utilizada en el ensayo de degradación, fue recolectada durante el mes de Junio del año 2006, en el plantel lechero ubicado en la Estación Experimental Maquehue, propiedad de la Universidad de La Frontera.

3.2.2. Implementación del sistema de degradación aerobia.

a) Acondicionamiento de la excreta de bovino: Para disminuir la humedad de la excreta, ésta se colocó sobre bandejas perforadas, con capacidad para 3 kg, y se hizo pasar una corriente de aire a temperatura ambiente. Una vez alcanzado 60% de humedad, se procedió a homogenizar la muestra y a adicionar glucosa como fuente de carbono lábil (Figura 3.2). La mezcla de excreta de bovino y glucosa tuvo las siguientes características: humedad: 60 %, P total: 0,4% y relación C:N: 22.

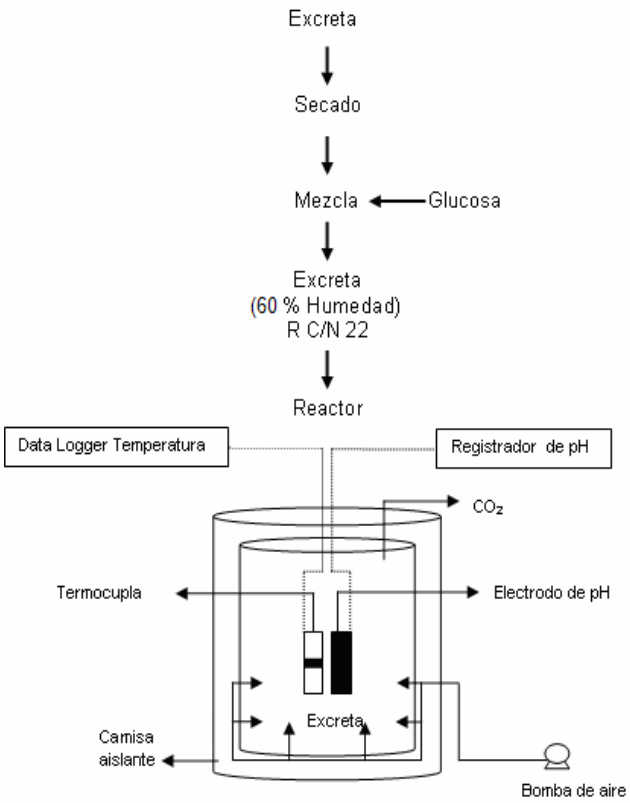
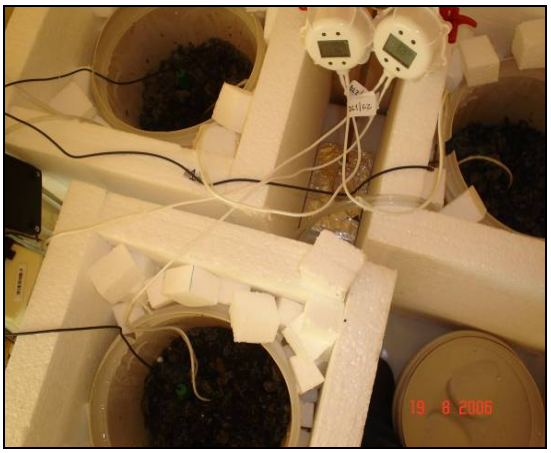


Figura 3.2. Esquema del sistema utilizado para la degradación aerobia de la excreta de bovino.

b) Montaje de los reactores: El montaje consistió, en la instalación de tres reactores cilíndricos de polipropileno (triplicado) con capacidad para 5 kg (Figura 3.3). Cada reactor

fue recubierto con una camisa aislante de poliestireno de 5 cm de espesor, y fue equipado con una bomba de aire (Cosmo 10000, Aquarium air pump double type 10000) para suministrar 300 mL aire min^{-1} kg^{-1}. Los tres reactores se mantuvieron a temperatura ambiente (entre 22 y 25°C) en una cámara con temperatura controlada para evitar las variaciones de temperatura que se producen entre el día y la noche. El seguimiento del proceso de degradación de la excreta de bovino, se extendió por 105 días; considerando la estabilización de la relación C:N en 14.

(a)



(b)

(c)

(d)

Figura 3.3. Reactores utilizados para la degradación aerobia de la excreta de bovino. Implementación de los reactores en el laboratorio (a). Vista de los reactores en triplicado (b). Datalogger para la medición de la temperatura (c). Registrador de pH (d).

3.2.3. Análisis realizados durante la degradación aerobia de la excreta de bovino.

a) Temperatura y pH: Para registrar la temperatura se utilizaron datalogger HI 141001 (Hanna Instrument). Para la medición del pH se utilizaron electrodos HI 1053B (Hanna Instrument) conectados a un dispositivo registrador de pH tipo Prober pH 8.

b) Pi extraído en agua: 0,3 g de excreta de bovino húmeda se extrajeron con 30 mL de agua desionizada, se adicionó carbón activado. La suspensión se agitó durante 16 h, a temperatura ambiente, posteriormente el extracto se filtró y en una alícuota de determinó la concentración de Pi por espectrofotometría, a 880 nm, mediante el método de Murphy y Riley (1962).

c) P biomásico: Se empleó la metodología utilizada en suelos, propuesta por Brookes et al., (1984) y descrita en Grace et al., (2006). 0,5 g de excreta húmeda se fumigaron con cloroformo por 24 h y luego se realizó la extracción de P biomásico con 25 mL de $NaHCO_3$ a pH 8,5. El contenido de P biomásico se calculó en base al incremento de Pi en la muestra de excreta fumigada, usando el factor de recuperación establecido de 0,4, el cual considera que solo el 40% del P de la biomasa es liberado con la solución de $NaHCO_3$; además, los valores fueron corregidos por el factor de adsorción de Pi en la excreta. La concentración del Pi se determinó por el método de Murphy y Riley (1962).

d) P total: Para el análisis de P total se utilizó la metodología descrita en AOAC (1980), que consistió en la digestión de la muestra con ácido nítrico y con ácido perclórico. La muestra se colocó en matraces de 125 mL y se adicionaron 20 mL HNO_3, luego los matraces se colocaron en una placa calefactora a 130 ºC hasta oxidar completamente la materia orgánica. Una vez enfriadas las muestras, se adicionaron entre 15 a 20 mL de $HCLO_4$. Nuevamente, los matraces se colocaron en la placa calefactora y lentamente se llevaron a ebullición, hasta que el volumen de la solución final fue de 3 mL. Una vez que los extractos estuvieron fríos, se adicionaron 25 mL de agua desionizada y se filtraron por un filtro Whatman Nº 41. El pH de los extractos ácidos, fue neutralizado con NaOH 10 N

utilizando ρ-nitrofenol, como indicador. La concentración de P se determinó por espectrofotometría, a 880 nm, mediante el método de Murphy y Riley (1962).

e) Iones intercambiables: Los iones intercambiables Ca, K, Mg y Na, se extrajeron con CH_3COONH_4 1M (pH 7,0) y los iones Zn, Cu, Mn, Fe y el Al se extrajeron con KCl 1M. La cuantificación se realizó por espectroscopia de absorción atómica (EAA), de acuerdo con la metodología descrita por Sadzawka et al., (2004b).

f) Especiación química: Para la especiación química se utilizó el programa Geochem-PC V.2.0 (Parker et al., 1987) y se consideraron las concentraciones de los cationes de intercambio y la concentración del Pi extraído en agua, de acuerdo a las metodologías de extracción, señaladas previamente.

g) Fraccionamiento secuencial de fósforo: Se realizó en muestras de excreta de los días 0, 30, 60 y 105. Se utilizó el fraccionamiento de P, propuesto por Hedley et al., (1982) y modificado por Ajiboye et al., (2004). El procedimiento de extracción consistió en adicionar, en forma secuencial, las siguientes soluciones: H_2O desionizada, $NaHCO_3$ 0,5M pH 8,5, NaOH 0,1 M y HCl 1M. A 0,3 g de excreta de bovino húmeda se le adicionaron 30 mL de cada solución extractante en forma secuencial, cada suspensión fue agitada durante 16 horas a temperatura ambiente, luego fue centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos; el sobrenadante fue removido y filtrado por una membrana de 0,45 µm. La concentración del Pi se cuantificó directamente en una alícuota de cada extracto, la concentración del Pt, de cada extracto, se determinó previa digestión con ácido nítrico y con ácido perclórico; luego de la digestión, la solución se neutralizó con NaOH 10 M y se utilizó ρ-nitrofenol como indicador. La concentración de P, en todos los extractos fue determinada por espectrofotometría, según el método de Murphy y Riley (1962). La concentración de Po de cada extracto, se calculó como la diferencia entre Pt y Pi. La concentración de P residual se calculó como la diferencia entre P total de la muestra y la suma de P total obtenido en cada fracción, adicionalmente se realizó digestión total con ácido nítrico y con ácido perclórico, a la fracción residual para verificar los contenidos de P.

h) Actividad fosfatasa: La determinación de la actividad fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina se realizó en muestras de los días 0, 30, 60 y 105. Se utilizó la metodología utilizada en suelos, propuesta por Tabatabai y Bremner (1969), descrita por Alef y Nannipieri (1995) y modificada por Rubio et al., (1989). Debido a la alta actividad fosfatasa detectada, se utilizaron 0,5 g de excreta de bovino húmeda; se empleó ρ-nitrofenilfosfato como sustrato y buffer universal modificado (MUB) a pH 6,0 y a pH 11 para la cuantificación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina, respectivamente. La concentración de ρ-nitrofenilfosfato utilizada fue de 0,4 M y se determinó a partir de curvas de saturación de la enzima, utilizando concentraciones de sustrato en el rango de 0,04 a 0,6 M.

i) Análisis de ^{31}P-RMN: Para el análisis de espectroscopia de ^{31}P-NMR se utilizaron muestras de los días 0, 30, 60 y 105. El P fue extraído con una solución de NaOH-EDTA de acuerdo a la metodología propuesta por McDowell y Stewart (2005). A 5 g de muestra se le adicionaron 100 mL de NaOH 0,25 M + EDTA 0,05 M. La suspensión se agitó por 16 h, a temperatura ambiente, a 180 golpes por minuto; luego las muestras se centrifugaron a 10000 rpm y el sobrenadante se filtró por una membrana de 0,45 µm. Cada sobrenadante fue congelado y liofilizado. Antes de congelar, se tomó una alícuota del extracto de NaOH-EDTA para determinar la concentración de Pi y Pt (mediante digestión con ácido nítrico y con ácido perclórico). Los porcentajes de recuperación de P obtenidos en todas las muestras alcanzaron el 60%. Los extractos de NaOH-EDTA liofilizados fueron enviados al Laboratorio de RMN de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile para realizar los análisis de ^{31}P RMN. Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance 400 a 161,97 MHz. Las muestras se conservaron a 20°C y se realizaron entre 6000 a 10000 scans para la obtención de las señales. Se utilizó un estándar externo de ácido fosfórico (d H_3PO_4 = 0,0 ppm). Las áreas de las señales se calcularon por integración utilizando el programa Mestrec. La estimación de la concentración del P aportado por los distintos compuestos se obtuvo por el método de comparación, el cual consiste en multiplicar la proporción de cada señal, con respecto al área total de las señales presentes en el espectro RMN (fosfato, pirofosfato y monoester fosfato), por la concentración de Pt en el extracto de NaOH-EDTA. Está metodología ha sido empleada por

diversos investigadores para estimar la concentración de P en muestras de purines, a partir del espectro de RMN (Turner, 2004; Turner and Leytem, 2004; McDowell and Stewart, 2005). La fracción del P proveniente del ácido fítico se calculó multiplicando por 6, el área de la señal del fosfato de la posición del C-2, que aparece en 5,85 ppm, (Turner 2004). La identificación de las señales se basó en los estudios realizados por Turner et al., (2003), Turner (2004), McDowell y Stewart (2005) y Toor et al., (2005).

j) Análisis estadísticos: Los datos presentados, corresponden al promedio 9 determinaciones (tres determinaciones por cada reactor) con su desviación estándar. Se utilizó la correlación bivariada de Pearson para establecer correlación entre las variables temperatura, pH, P biomásico, Pi extraído en agua. Los datos provenientes del fraccionamiento secuencial de P, se analizaron mediante el análisis de varianza (ANDEVA) de muestras repetidas, a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.4. Análisis bacteriológicos realizados durante la degradación aerobia de la excreta de bovino.

a) Estimación de las bacterias mesófilas cultivables totales (BCT) y de las bacterias que utilizan fitato (BUF). El recuento de bacterias mesófilas se realizó en distintos tiempos de degradación de la excreta de bovino. Para el recuento de bacterias mesófilas cultivables totales (BCT), se mezcló 1 g de excreta de bovino con 20 mL de solución salina estéril (NaCl 0,9%) y la suspensión se agitó vigorosamente por 10 min. Posteriormente, se realizaron las diluciones 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6}, que fueron sembradas en placas sobre medio agar Luria-Bertani (LB, 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl y 0,4% D-glucosa, por litro de agua destilada). El medio de cultivo fue suplementado con 100 µg mL^{-1} de cicloheximida para prevenir el crecimiento de hongos. La incubación de las placas para el recuento de BCT se realizó durante 48 h, a 30°C. Posteriormente, se eligieron al azar entre 150 y 300 unidades formadoras de colonias (CFU) que crecieron sobre el medio LB, las que fueron transferidas en placas que contenían medio de cultivo selectivo para el crecimiento de bacterias mesófilas que utilizan fitato (BUF). El medio de cultivo selectivo para fitato (MSF), que se utilizó fue descrito por Kerovuo et al., (1998); el MSF fue

preparado con 2% D-glucosa, 0,4 % fitato de sodio, 0,2% $CaCl_2$, 0,5% NH_4NO_3, 0,05% KCl, 0,05% $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,001% $FeSO_4 \times 7H_2O$ y 0,001% $MnSO_4 \times H_2O$, por litro de agua destilada. El recuento de BUF se estableció en base a la formación de un halo transparente alrededor de cada CFU sobre el medio MSF, después de un periodo de incubación de 4 días a 30 °C. Posteriormente, se procedió a clasificar las diferentes BUF de acuerdo al morfotipo. Para aislar cada morfotipo y obtener un cultivo puro se sembró una CFU de cada morfotipo utilizando la técnica de siembra por estrías en medio LB. Luego, se confirmó la capacidad utilizadora de fitato sembrando nuevamente el aislado puro sobre el medio MSF. Los aislados puros de los diferentes morfotipos de BUF se conservaron en medio LB: glicerol (proporción 7:3) y fueron almacenados a -80°C para realizar la caracterización genética.

b) Estimación de la capacidad de los morfotipos de BUF, para solubilizar fosfato de calcio. Esta prueba consistió en sembrar los aislados puros en placas que contenían medio "Research Institute's phosphate growth (NBRIP)" con la siguiente composición: 1% D-glucosa, 0,5% $Ca_3(PO_4)_2$, 0,5% $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0,025% $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,02% KCl y 0,01% $(NH_4)_2SO_4$, por litro de agua destilada, descrito por Nautiyal (1999).

Para la evaluación de la capacidad de utilización de fitato y de solubilización de fosfato de calcio, se utilizó una escala cualitativa basada en el diámetro del halo de decoloración generado por la CFU:

++: halo de decoloración > 0,5 cm de diámetro.
+ : halo de decoloración entre 0,2 y 0,5 cm de diámetro.
- : no se observó el halo de decoloración.

c) Estimación de actividades enzimáticas de los morfotipos de BUF. Para la detección de las actividades enzimáticas de los aislados de BUF, se utilizó el test API® ZYM (Laboratorio Biomerieux). Para este procedimiento se siguieron las indicaciones recomendadas por el fabricante.

d) Caracterización genética de las BUF basada en el gen 16S rDNA. La caracterización genética se realizó a los aislados puros de BUF, mediante el análisis de secuencia del gen 16S rDNA. Cada aislado bacteriano se sembró en medio líquido LB, y se agitó durante 24 h a 30 °C, en un baño de agua termoregulado. Luego, las células se lavaron con solución salina (0,9%) y se concentraron mediante sucesivos eventos de centrifugación. Una vez que las células se concentraron, se procedió a la extracción del DNA mediante tres ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido. Los segmentos del gen 16S rDNA se amplificaron por la técnica polymerase chain reaction (PCR) utilizando los partidores EUB f933 (5'-GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G-3') y EUB r1387 (5'-GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG-3'), de acuerdo a la metodología descrita por Iwamoto et al., (2000). La amplificación de PCR se realizó utilizando los reactivos del kit GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega Co., Madison, WI, USA). La mezcla de reactivos para PCR se preparó en 50 µL, utilizando agua libre de DNA y tuvo la siguiente composición: 0,25 µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase, 20 pmol de cada primer, 6 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 5 µL de cada dNTPs (2 mM) y 10 µL de 5× Green GoTaq® Flexi Buffer. La técnica de PCR se desarrolló de la siguiente forma: calentamiento inicial a 95°C por 10 minutos; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min; alineamiento a 55°C por 1 min; extensión a 72°C por 3 min y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se purificaron con el kit E.Z.N.A. ® Cycle-Pure (Omega Bio-Tek, Inc., Doraville, GA, USA). Los segmentos del gen 16S rDNA fueron secuenciados por Macrogen Ltda. (Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas se analizaron usando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); el análisis consistió en la comparación de la serie de nucleótidos obtenida, con la secuencia de nucleótidos expuesta en la base de datos pública (Megablast), de esta forma, se encontraron bacterias estrechamente relacionadas por medio de secuencias muy similares. Las secuencias obtenidas en este estudio fueron depositadas en la base de datos GenBank.

3.3. Inoculación de BUF en la excreta de bovino degradada (EBD).

Para la inoculación de la EBD, se utilizaron dos aislados de BUF identificados durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino (punto 3.2.4).

3.3.1. Preparación del inóculo inicial.

Consintió en inocular 50 µL de cada cultivo bacteriano puro (almacenado a -80 °C en glicerol), en medio de cultivo líquido LB. Cada cultivo se mantuvo con agitación, en un baño de agua termoregulado a 30 ºC, durante 24 h. Después de ese periodo, se procedió al lavado de las células bacterianas, mediante tres ciclos de centrifugación y lavado con una solución salina estéril (0,9 %). Posteriormente, las células bacterianas fueron resuspendidas en 25 mL de la solución salina (0,9 %). Esta suspensión se homogenizó y se utilizó como inóculo inicial para inoculación de la EBD. Durante todo el procedimiento se utilizó material debidamente esterilizado.

3.3.2. Inoculación de las BUF en la EBD.

Muestras de 0,5 g de EBD (45 % de humedad), fueron inoculadas con 1 mL de inóculo inicial; los controles consistieron en muestras de 0,5 g de EBD, más 1 mL de solución salina (se utilizaron muestras y controles en triplicado). La incubación se realizó a 30°C durante 10 días. La determinación del Pi se realizó a diferentes tiempos, a 2, 6, 8, 24 horas, y a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días. Para la extracción de Pi se utilizaron 25 mL de una solución de bicarbonato de sodio 0,5 M pH 8,5 y se procedió según la metodología descrita por Sadzawka et al., (2004b). La concentración de Pi se determinó por espectrofotometría, según el método de Murphy y Riley (1962).

3.3.3. Análisis estadísticos.

Los datos presentados, corresponden al promedio de las réplicas (N=3), con su desviación estándar. Se utilizó la correlación bivariada de Pearson para establecer correlación entre las variables temperatura, pH, P biomásico, P extraído en agua y recuento de BCT.

3.4. Aplicación de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD).

3.4.1. Cinética de liberación de fósforo.

Para la liberación de Pi desde la EBD, se utilizó ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico y ácido glucónico. Para los estudios cinéticos se pesaron 0,05 g de EBD (45% humedad) y se adicionaron 25 mL de una solución 5mM de ácido orgánico, previamente ajustado a pH

5,5, con fuerza iónica de 0,1 M en KCl. Se adicionó 1 gota de cloroformo a cada muestra. Las muestras se incubaron a 25 °C en un baño de agua termoregulado, sin agitación, durante distintos tiempos: 0,5; 1; 3; 6; 8; 12; 16 y 24 h. Una vez finalizado el tiempo de contacto, se filtró el sobrenadante por una membrana de 0,45 µm. En el líquido filtrado se determinó la concentración de Pi por espectrofotometría, según el método de Murphy y Riley (1962).

La cinética de liberación de Pi fue modelada utilizando la ecuación de Elovich (Ecuación 1)

$$\mathbf{q = (1/\beta) * \ln (\alpha\beta) + (1/\beta) * \ln t} \qquad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

q (mmol g^{-1}):	Cantidad de Pi liberado a tiempo t
α (mmol g^{-1} h^{-1}):	Constante de velocidad inicial de liberación de Pi
β (mmol g^{-1})$^{-1}$:	Constante de liberación de Pi

La especiación química de los cationes presentes en la EBD y de los ácidos orgánicos adicionados se realizó utilizando el programa Geochem-PC V.2.0 (Parker et al., 1987).

3.4.2. Isotermas de liberación de fósforo y de adsorción de ácidos orgánicos.

Una vez determinado el tiempo de equilibrio, se procedió a realizar las isotermas de liberación de Pi. Para este ensayo se utilizaron soluciones de cada ácido, de concentración 0, 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM, con fuerza iónica 0,1 M en KCl. A 0,05 g de EBD (45% humedad) se le adicionaron 25 mL de cada ácido (previamente ajustado a pH 5,5). Se adicionó 1 gota cloroformo a cada muestra. Las muestras se incubaron por 16 h a 25°C en un baño de agua termoregulado, sin agitación. Una vez finalizado el tiempo de equilibrio, se filtró el sobrenadante por una membrana de 0,45 µm. En los líquidos filtrados se determinaron las concentraciones de Pi y de los distintos ácidos orgánicos. El Pi fue determinado por espectrofotometría según el método de Murphy y Riley (1962). Se utilizó el programa Geochem-PC V. 2.0, para la especiación química de los cationes y los aniones orgánicos.

La adsorción de los ácidos orgánicos se modeló utilizando la ecuación de Freundlich (Ecuación 2) y la ecuación de Langmuir (Ecuación 3).

Isoterma de Freundlich:

$$\mathbf{x : a\, C_e^{(1/b)}} \qquad \text{Ecuación 2}$$

Donde

x (mmol g^{-1}):	Cantidad de anión adsorbido por unidad de adsorbente
C_e (mmol L^{-1})	Concentración del anión en equilibrio
a	Capacidad relativa de adsorción
1/b	Constante de afinidad

Isoterma de Langmuir:

$$\mathbf{x : \frac{Xm\ k\ Ce}{(1+kCe)}} \qquad \text{Ecuación 3}$$

Donde

x (mmol g^{-1}):	Cantidad de anión adsorbido por unidad de adsorbente
C_e (mmol L^{-1}):	Concentración del anión en equilibrio
k (L $mmol^{-1}$):	Constante de equilibrio
X_m (mmol g^{-1}):	Cantidad máxima que puede ser adsorbida

3.4.3. Determinación de ácidos orgánicos.

La concentración en equilibrio del ácido cítrico, málico y glucónico fue determinada mediante cromatografía líquida de alta precisión HPLC, usando un equipo Lachrom Cromathograph acoplado a un detector UV-Vis (λ=210 nm). Se utilizó una columna RP-18 (tamaño de partícula de 5 μm) y como fase móvil, se empleo ácido fosfórico 200 mM. La concentración en equilibrio del ácido oxálico fue determinada mediante cromatografía

iónica, usando un equipo Dionex CS 90 con columna y pre-columna ion Pac AS11-HC y AG11-HC, respectivamente. Como fase móvil, se utilizó NaOH 25 mM. La cantidad de los ácidos adsorbidos se calculó como la diferencia entre la concentración inicial del ácido orgánico en la solución y la concentración del ácido orgánico remanente en el sobrenadante, una vez finalizado el tiempo de equilibrio.

3.4.4. Análisis estadísticos.

Los datos presentados, corresponden al promedio de las replicas (N=3) con su desviación estándar. Los resultados obtenidos entre las distintas dosis y los distintos ácidos fueron analizados mediante ANDEVA. Las diferencias significativas fueron determinadas a un nivel de significancia de 0,05.

3.5. Aplicación de la excreta de bovino degradada (EBD) en un suelo de origen volcánico.

Para este ensayo se utilizó un Andisol de la serie Piedras Negras, de la localidad de Río Bueno del perfil 0-20 cm, que presentó las siguientes características: P Olsen: 2 mg kg^{-1}, pH: 5,4 y MO: 18%. La EBD presentó las siguientes características: pH: 8,8; humedad: 45%; P total: 0,8%, Ca: 1,5%, Al: 0,45%, Fe: 0,35%.

3.5.1. Incubación de un Andisol con EBD.

Las dosis de aplicación de la EBD, se calcularon tomando como referencia la aplicación de 100, 200, 300 y 600 m^3 purin ha^{-1}, considerando un purín con 5% de materia seca; lo cual originó dosis de aplicación, en base a materia seca, de 0 (control), 3, 6, 9 y 18 g EBD kg^{-1} suelo, las cuales contenían 0, 24, 48, 72 y 144 mg P total kg^{-1} suelo, respectivamente.

Para las incubaciones se trabajó con el suelo a capacidad de campo, y se utilizaron muestras destructivas de 200 g (3 réplicas por cada dosis), las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 64 días. Después de 48 h de incubación se tomó la primera muestra para realizar las determinaciones de pH, de P disponible (Pt, Pi y Po en el extracto de bicarbonato de sodio) y de P biomásico.

a) Determinación del pH: El pH se midió en agua destilada en relación 1:2,5.

b) P disponible: A 2,5 g de suelo húmedo se le adicionaron 50 mL de bicarbonato de sodio, (sin la adición de carbón activado) de acuerdo a la metodología descrita en Sadzawka et al., (2004b). La suspensión se agitó por 30 minutos y luego se filtró. En el sobrenadante se determinó la concentración de Pt, Pi y Po.

- **Determinación del Pi en el extracto de bicarbonato de sodio:** A 25 mL del sobrenadante se le adicionaron 0,15 g de carbón activado, la suspensión se agitó por 10 minutos, luego se filtro y en el líquido filtrado se midió directamente la concentración de Pi según el método de Murphy y Riley (1962).
- **Determinación del P total en el extracto de bicarbonato de sodio:** Se realizó previa digestión alcalina, utilizando persulfato de potasio acidificado en autoclave, de acuerdo con la metodología descrita por Bristow (2007). Para este procedimiento, se realizaron apropiadas diluciones de los extractos de bicarbonato en un volumen de 20 mL y se colocaron en frascos autoclavables, luego se adicionaron 0,15 g de persulfato de potasio y 1 mL de H_2SO_4 0,505 M. Posteriormente, las muestras se homogenizaron y se llevaron a autoclave, donde alcanzaron una temperatura de 120°C. Una vez enfriadas las muestras, se determinó la concentración de P por espectrofotometría según el método de Murphy y Riley (1962).
- **Determinación del Po en el extracto de bicarbonato de sodio:** La concentración de Po en el extracto de bicarbonato de sodio fue obtenida como la diferencia entre Pt y Pi.

c) P biomásico: Se utilizó la metodología propuesta por Brookes et al., (1984) y descrita en Grace et al., (2006). 1,25 g de suelo húmedo se fumigaron con cloroformo por 24 h y luego se realizó la extracción de P biomásico con 25 mL de $NaHCO_3$ a pH 8,5. El contenido de P biomásico se calculó en base al incremento de Pi en la muestra de excreta fumigada, usando el factor de recuperación establecido de 0,4; además, los valores fueron corregidos por el factor de adsorción de Pi en el suelo. La concentración de Pi se determinó por el método de Murphy y Riley (1962).

3.5.2. Análisis estadísticos.

Los datos presentados, corresponden al promedio de las replicas (N=3) con su desviación estándar. Los resultados obtenidos entre los distintos tratamientos y los distintos tiempos fueron analizados mediante ANDEVA. Las diferencias significativas fueron determinadas a un nivel de significancia de 0,05.

3.6. Estudios de la disponibilidad de P en la rizósfera de *Lolium perenne,* utilizando un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

3.6.1. Diseño de los rizotrones.

Los rizotrones utilizados se diseñaron de acuerdo al modelo descrito por Wang et al., (2004). Para su construcción se utilizaron láminas de policarbonato de 33 cm de longitud, 12 cm de ancho y 2,5 cm de profundidad (Figura 3.4). Los rizotrones fueron colocados con un ángulo de 30º con el objetivo de forzar el crecimiento radical hacia la parte posterior del rizotrón (Figura 3.4 y 3.5). Para la obtención de la solución rizosférica se utilizaron micro-muestreadores modelo Rhizon SMS, de 10 x 2 mm, éstos se insertaron en una lámina perforada dispuesta en la cara frontal del rizotrón (Figura 3.5).

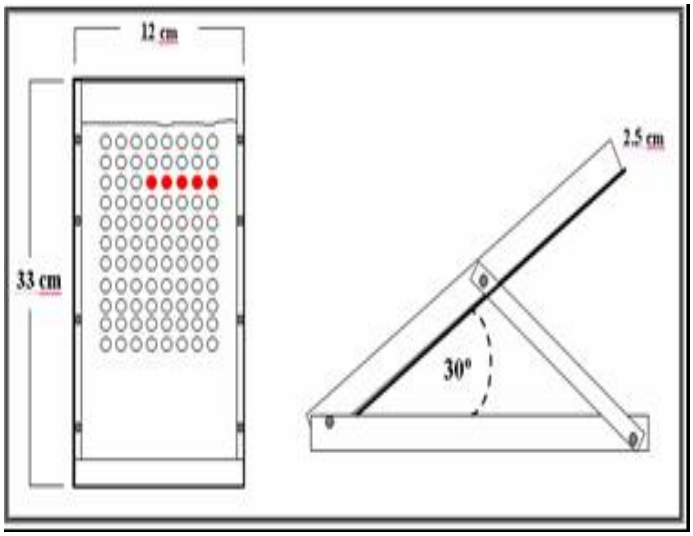


Figura 3.4. Tipo de rizotrón utilizado para evaluar la disponibilidad de P en la rizósfera de *Lolium perenne*.

3.6.2. Plántulas utilizadas.

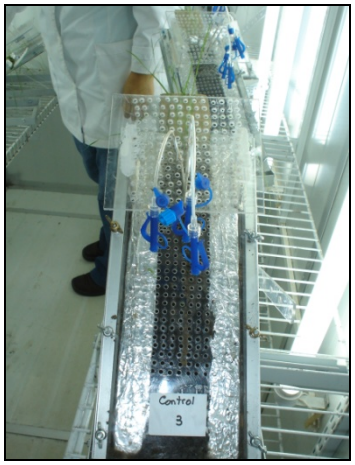
Para los estudios rizosféricos se utilizaron plántulas de la especie *Lolium perenne,* correspondientes al cultivar Nui. Las plántulas fueron obtenidas a partir de semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%. La germinación de las semillas se llevó a cabo por 7 días en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura y de humedad. Posteriormente, éstas fueron depositadas en solución de nutrientes (Taylor y Foy, 1985) donde permanecieron por 7 días. Finalizado este periodo, las plántulas fueron transferidas a los rizotrones.

3.6.3. Montaje de los rizotrones.

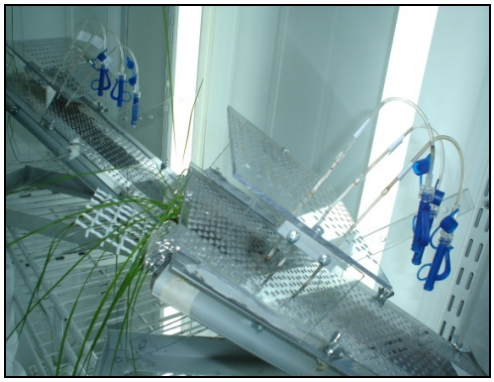
En este ensayo se utilizó la EDB y el Andisol de la Serie Piedras Negras (perfil 5-15 cm), descritos en el punto 3.5. Las dosis de aplicación de EBD, en base a materia seca, fueron 0 (control), 3, 6 y 9 g EBD kg^{-1} suelo, y su contenido de P total fue de 0, 24, 48 y 72 mg kg^{-1} suelo, respectivamente. El ensayo fue establecido bajo condiciones controladas de temperatura (20 ºC) y de humedad (70 %).

Para el ensayo en rizotrones, el suelo se pre-incubó durante 2 días, con las diferentes dosis de EBD; después de este periodo, se procedió al llenado de los rizotrones, y a la transferencia de las plántulas de *Lolium perenne*. En cada rizotrón se colocaron 250 g de las mezclas suelo - EBD, y se plantaron 6 plántulas de *Lolium perenne* de tamaño uniforme. Para cada dosis de EBD se implementaron 3 rizotrones. En cada rizotrón se ubicaron tres micro-muestreadores, de solución rizosférica, a una distancia de 2 mm de la raíz principal. Después de 2 días del montaje, se aplicó una dosis de N (como NH_4Cl) de 50 mg kg^{-1} suelo. Después del cuarto día, se inició el muestreo de la solución rizosférica cada 48 h, por un periodo de 12 días. El muestreo consistió en la extracción de 1,5 mL de solución rizosférica, la cual fue filtrada inmediatamente por una membrana de 0,22 µm. Los rizotrones fueron manejados a capacidad de campo durante todo el período experimental.

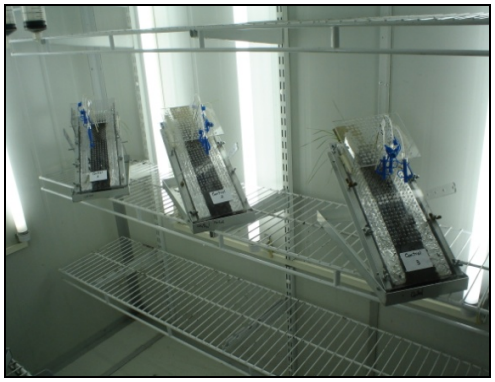
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.5. Montaje de los rizotrones utilizados para evaluar la disponibilidad de P en la rizósfera de *Lolium perenne*. Rizotrón utilizado (a). Placa perforada frontal para el montaje de los rizones (b). Rizones para la succión de la solución rizosférica (c). Rizotrones instalados en la cámara de crecimiento (d).

3.6.4. Análisis realizados en la solución rizosférica.

a) Determinación del pH: El pH de la solución rizosférica, se midió utilizando un microelectrodo Termo-Orion.

b) Determinación de fosfato y de aniones orgánicos: Las concentraciones de fosfato, formiato, acetato y oxalato, se determinaron utilizando el cromatógrafo iónico DIONEX modelo ICS 90-Ion; para lo cual se empleó una columna de intercambio aniónico IonPac AS11-HC, con supresor de conductividad AMMS III 4mm. Como fase móvil se utilizó

NaOH 25 mM, y como solución regenerante se utilizó H_2SO_4 50 mN. La concentración de citrato fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando un equipo Lachrom Cromathograph acoplado a un detector UV-Vis (λ=210 nm); se utilizó una columna RP-18 (tamaño de partícula de 5 µm), y como fase móvil se empleó ácido fosfórico 200 mM pH 2,1.

3.6.5. Análisis estadísticos.

Los datos presentados, corresponden al promedio de 9 determinaciones (tres determinaciones por cada rizotrón) con su desviación estándar. Los contenidos de materia seca y de P obtenidos en los distintos tratamientos fueron analizados mediante ANDEVA. Las diferencias significativas fueron determinadas a un nivel de significancia de 0,05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Caracterización de la excreta de bovino.

La composición de la excreta de bovino se muestra en la Tabla 4.1. El contenido de P total estuvo entre 4,4 y 7,6 g kg^{-1}, valores similares a los reportados por Baeza (2002) y por McDowell y Stewart (2005), quienes indicaron concentraciones de P total iguales a 4,2 y 5,5 g kg^{-1}, respectivamente. Las variaciones en los contenidos de P en purines y en excretas han sido atribuidas a la alimentación del animal, especialmente a los suplementos minerales y a la ingesta de grano y/o pastura (Dou et al., 2000; Sharpley y Moyer 2000; Ajiboye et al., 2004; McDowell y Stewart, 2005). Ajiboye et al., (2004) reportaron valores de P total entre 2,5 y 5,5 g kg^{-1} en purines de origen bovino. He et al., (2004a) informaron un amplio rango de P total en purines de lechería, con valores entre 4,1 y 18,3 g kg^{-1}. Por otra parte, se ha señalado que el contenido de P total en excretas de bovino es menor que en excretas de cerdo, ave y biosólidos; donde se han encontrado valores de 16, 26 y 18,4 g kg^{-1}, respectivamente (Leinweber et al., 1997; Ajiboye et al., 2004).

Tabla 4.1. Caracterización de la excreta de bovino (en base a materia seca) recolectada durante el periodo 2005-2006.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Humedad (%)	74 - 88	**Mg** (g kg^{-1})	5,0 - 5,2
pH	6,6 – 6,9	**K** (g kg^{-1})	6,7 - 11
C (%)	41 - 47	**Na** (g kg^{-1})	2,1 - 4,3
N (%)	2,5 -3,2	**Ca** (g kg^{-1})	10 - 18
P (g kg^{-1})	4,4 -7,6	**Mn** (g kg^{-1})	0,47 – 0,79
Relación C/N	13 - 19	**Cu** (mg kg^{-1})	24 - 40
FDN (%)	52 - 55	**Zn** (mg kg^{-1})	13 – 53
Al (g kg^{-1})	1,2 – 6,2	**Fe** (g kg^{-1})	2,1 – 6,4

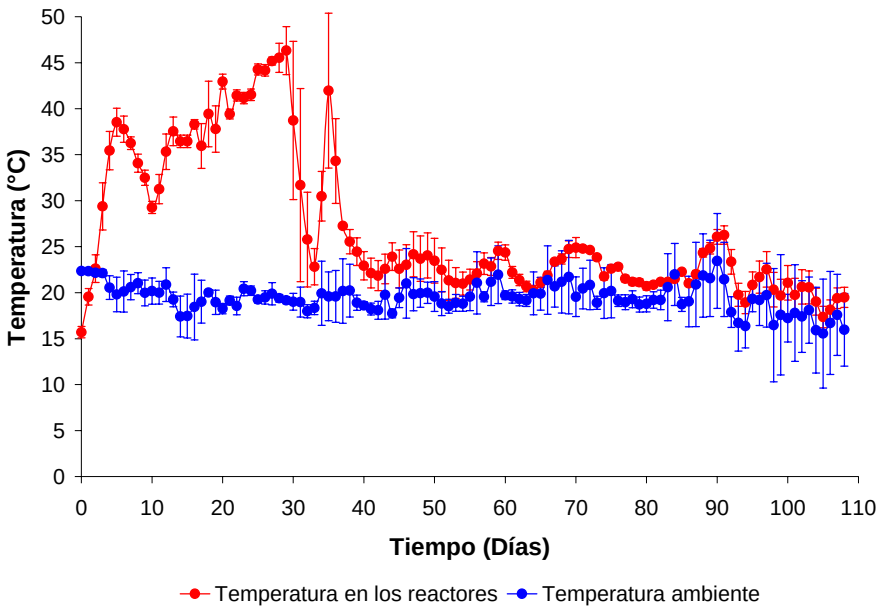
El contenido de metales totales de la excreta de bovino se presenta en la Tabla 4.1; los valores observados corresponden a las variaciones normales del forraje que se produce en

las distintas estaciones del año. Se observó que el calcio se encuentra en mayor cantidad y varió en el rango de 10 a 18 g kg^{-1}, en tanto que el Fe y el Al alcanzaron los 6 g kg^{-1}. El contenido de Fe y de Al depende de la composición del forraje, adicionalmente el animal durante el pastoreo junto con el forraje ingiere suelo lo cual incrementa la concentración de ambos elementos en la excreta. Los estudios de McDowell y Stewart (2005) indicaron que la excreta de ganado lechero contiene 4, 9 y 10 g kg^{-1} de Fe, Al y Ca respectivamente. Ajiboye et al., (2004) informaron que en purines de lechería los contenidos de Fe, Al y Ca, se encuentran en el orden de 10, 21 y 22 g kg^{-1}, respectivamente. Por otra parte, Frossard et al., (2002) determinaron que en compost de purines, el Fe varía entre 9 y 15 g kg^{-1}, el Al varía entre 9 a 14 g kg^{-1} y el Ca varia entre 34 a 45 g kg^{-1}.

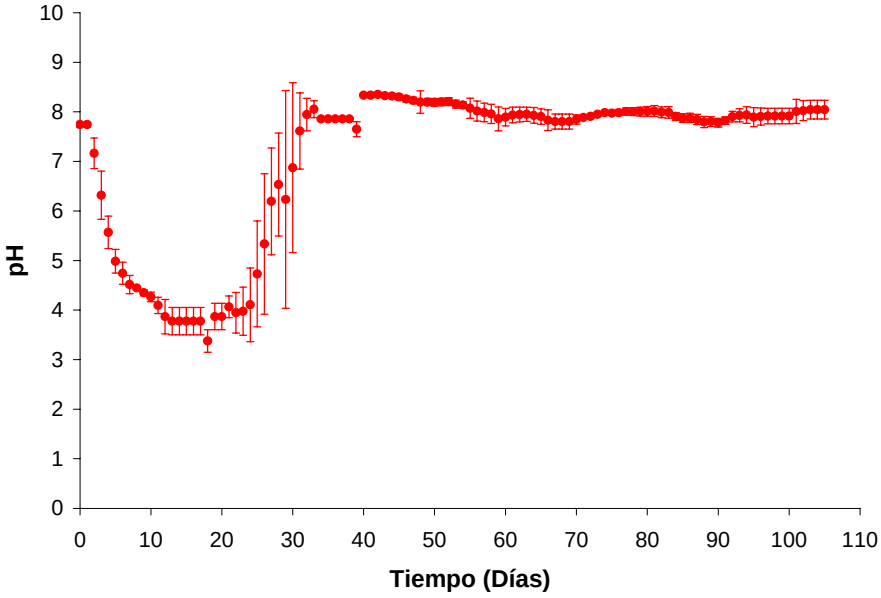
4.2. Ensayo de degradación aerobia de la excreta de bovino.

4.2.1. Monitoreo de la temperatura y del pH.

Los cambios de temperatura registrados durante la degradación aerobia de los residuos orgánicos, indicaron el desarrollo de la fase bioxidativa y de la fase de maduración. Dentro de la fase bioxidativa se incluyen las etapas mesófila, termófila y de enfriamiento (Bernal et al., 2008). En este estudio, la variación de la temperatura (Figura 4.1a), indicó que la etapa mesófila se produjo durante los tres primeros días, cuando ésta incrementó desde 15 hasta 23 ºC. Este periodo está asociado a la degradación de fuentes lábiles de carbono por parte de los microorganismos mesófilos (Bernal et al., 2008). La etapa termófila, se originó a partir del cuarto día, alcanzando temperaturas promedio de 47 ºC, y se extendió hasta los 30 días, aproximadamente. Es común que, durante ese periodo, se produzca una sucesión de microorganismos y se vea favorecido el desarrollo de los microorganismos termófilos por sobre los microorganismos mesófilos (Atlas y Bartha, 1997); además, es la etapa donde se genera la máxima degradación de la materia orgánica (Bernal et al., 2008). La etapa de enfriamiento comenzó entre los días 35 y 40, cuando se observó un descenso de la temperatura. Posterior a esta etapa este parámetro se mantuvo constante alrededor de los 23°C, indicando que el residuo permaneció en la fase de maduración.



(a)



(b)

Figura 4.1. Monitoreo de la temperatura (a) y del pH (b) durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino.

Durante la degradación de la excreta, se registró un decrecimiento del pH hasta el día 30 (Figura 4.1b) y se alcanzó un valor mínimo de 4,0. Posteriormente el pH se estabilizó en un

valor cercano a 8,0, coincidiendo con la estabilización de la temperatura. Estudios de Jang et al., (2002) y de Choi y Park, (1998) mostraron que durante el compostaje de materiales orgánicos fácilmente biodegradables, la disminución del pH alcanza valores entre 4,0 y 4,8, para luego aumentar hasta valores cercanos a 9,0, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. La variación del pH que se produce durante el proceso de degradación aerobia, esta asociada con la cinética microbiana, en términos del consumo de carbono y de nitrógeno, y con la liberación de compuestos metabólicos de desecho (Atlas y Bartha, 1997). El decrecimiento inicial del pH se relaciona con la liberación de ácidos orgánicos debido al consumo de fuentes lábiles de C presentes en el medio (Singh y Amberger, 1997). El posterior incremento del pH se asocia al proceso de amonificación de los componentes orgánicos presentes en el sistema (Jang et al., 2002).

4.2.2. Dinámica de Pi en agua y de P biomásico.

La extracción de P en agua se utiliza como indicador del P inmediatamente disponible (Traoré et al., 1999; Parham et al., 2002; He et al., 2004b; He et al., 2005), si bien éste puede ser aprovechado por los cultivos, también podría ser movilizado hacia cuerpos de agua causando problemas de eutroficación (Sharpley et al., 2004; Kleinman et al., 2005; Wolf et al., 2005). El P extraído en agua se compone de Pi y de Po soluble. El Pi se encuentra inmediatamente disponible para las plantas, en cambio el Po es considerado disponible previo proceso de mineralización. Durante la degradación de la excreta de bovino, se observó un aumento del Pi en agua (Figura 4.2) desde 550 a 1890 mg kg^{-1} durante los primeros 45 días, luego el Pi se mantuvo alrededor de los 1500 mg kg^{-1}. La concentración de Pi en agua es producto del equilibrio que se genera entre los procesos microbiológicos y físico-químicos que ocurren simultáneamente en el sistema. Estos procesos incluyen reacciones de adsorción-desorción sobre la superficie de la matriz del residuo o coloides en suspensión, complejación con iones en solución, precipitación, mineralización e inmovilización.

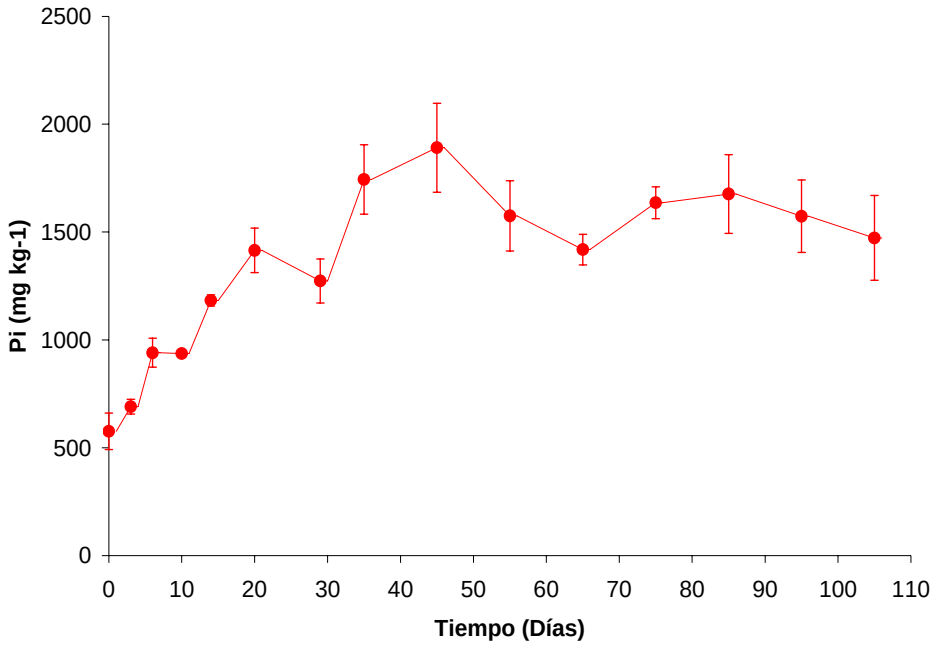


Figura 4.2. Dinámica del Pi extraído en agua, durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino.

Las dinámica de P biomásico se muestra en la Figura 4.3, los valores más altos fueron detectados durante la etapa inicial de la degradación de la excreta, mientras se registraron altas temperaturas (Figura 4.1a) y valores de pH bajos (Figura 4.1b). La máxima concentración de P biomásico alcanzó 872 mg kg^{-1} en el día 30, luego decreció hasta 200 mg kg^{-1}, manteniéndose constate en este valor. Sharpley y Moyer (2000) informaron contenidos de P biomásico de 1272 mg kg^{-1} y de 95 mg kg^{-1} en purines de lechería y en compost de purines de lechería, respectivamente. El P contenido en la biomasa microbiana, es un indicador de P potencialmente disponible. Si bien el P se encuentra inmovilizado en la biomasa microbiana, el recambio de microorganismos permite que el P proveniente del rompimiento celular, pueda ser ciclado nuevamente; disminuyendo así, la posibilidad de fijación que llevaría a la formación de especies menos disponibles.

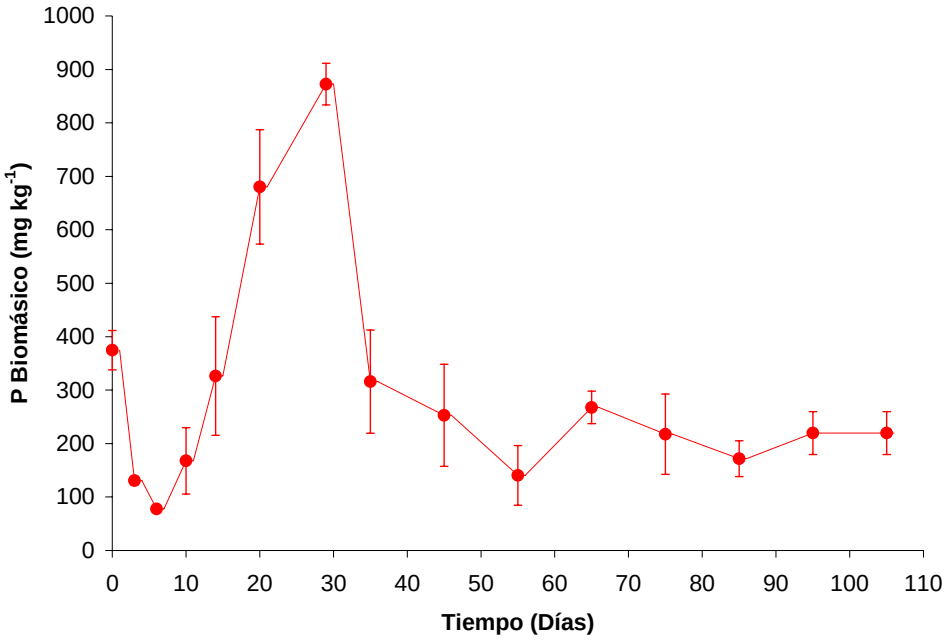


Figura 4.3. Dinámica del P biomásico, durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino.

El P biomásico fue correlacionado con la temperatura y con el recuento de las bacterias mesófilas, mostrando correlación con la temperatura (r = 0,6; $P \leq 0,05$), pero no con las bacterias mesófilas (r = 0,3; $P \leq 0,05$). Por otra parte, la temperatura mostró correlación inversa con el pH (r: -0,7; $P \leq 0,05$). Se ha informado que las altas temperaturas y los bajos valores de pH favorecen el desarrollo de levaduras y de bacterias termófilas (Choi y Park, 1998; Hassen et al., 2001). Por lo tanto, se puede esperar que las altas concentraciones de P biomásico encontradas durante los primeros 35 días de degradación (Figura 4.3) se hayan originado por el predominio de microorganismos como levaduras, hongos y bacterias termófilas y no por la presencia de bacterias mesófilas.

Las principales reacciones que influyen en la disponibilidad de P, ocurren durante el primer mes de degradación de los residuos orgánicos, debido a la intensa mineralización de la materia orgánica (Traoré et al., 1999). Se ha sugerido que durante el proceso de compostaje, la materia orgánica controlaría la concentración de Pi en solución, debido al efecto inhibidor de los compuestos orgánicos sobre la precipitación de P y a la competencia de éstos, por los sitios de adsorción (Frossard et al., 2002). Estudios de Singh y Amberger,

(1997), han informado la presencia de distintos ácidos orgánicos (ácido cítrico, acético, málico, succínico, glicólico, fumárico y tartárico) durante periodo de intensa mineralización de los residuos orgánicos. Estos ácidos pueden tener un efecto directo sobre el aumento de la disponibilidad de P, puesto que compiten con los sitios de adsorción, desplazan el P adsorbido en la matriz del residuo y solubilizan fosfatos presentes en el sistema.

4.2.3. Dinámica de Al, Fe y Ca intercambiables.

La dinámica de los iones intercambiables, Al, Fe y Ca, se muestra en la Figura 4.4. Se observó que el periodo de mayor disponibilidad de Al y Fe fue durante los primeros 30 días, lo cual fue relacionado con la disminución de pH del medio (Figura 4.1b). Durante ese tiempo, se determinó que las concentraciones de Al y Fe alcanzaron valores de 25 y 40 mg kg^{-1}, respectivamente. Después del día 30, la concentración de ambos elementos decreció bajo el límite de detección del equipo de EAA, lo cual se debió, posiblemente, a la formación de hidróxidos de Al y Fe, que se originan a pH alcalinos (Figura 4.1b). Consecuentemente, durante el primer mes la concentración de Ca intercambiable fue del orden de 1500 mg kg^{-1}, y a partir del día 30 incrementó, alcanzando un valor promedio de 2500 mg kg^{-1}.

A través de la especiación química realizada se determinó que, durante el primer mes de degradación de la excreta, el Pi estuvo expuesto a la formación de complejos con los iones Ca^{2+}, Mg^{2+}, H_3O^+, Zn^{2+} y Al^{+3} y a la formación de precipitados con Mn^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+3}, Al^{+3} y Ca^{2+}. A partir del día 30, cuando se registraron valores de pH cercanos a 8,0 (Figura 4.1b), se vieron favorecidas las interacciones de Pi con Ca, lo cual pudo originar la formación de fosfatos de calcio con distinto grado de solubilidad. Los resultados obtenidos, indicaron que los principales iones que interaccionan con el Pi disponible, mediante la formación de complejos y de precipitados, son el Al, el Fe y especialmente el Ca que tendría un efecto determinante en cuanto a la dinámica y el equilibrio de Pi en agua. En este contexto, se ha reportado que la solubilidad de P en purines es controlada por la concentración de iones Al, Fe y especialmente Ca debido a que es el catión dominante en este tipo de residuos orgánicos (Barrow, 1975; Dou et al., 2000; Griffin et al., 2003; Sharpley y Moyer, 2000).

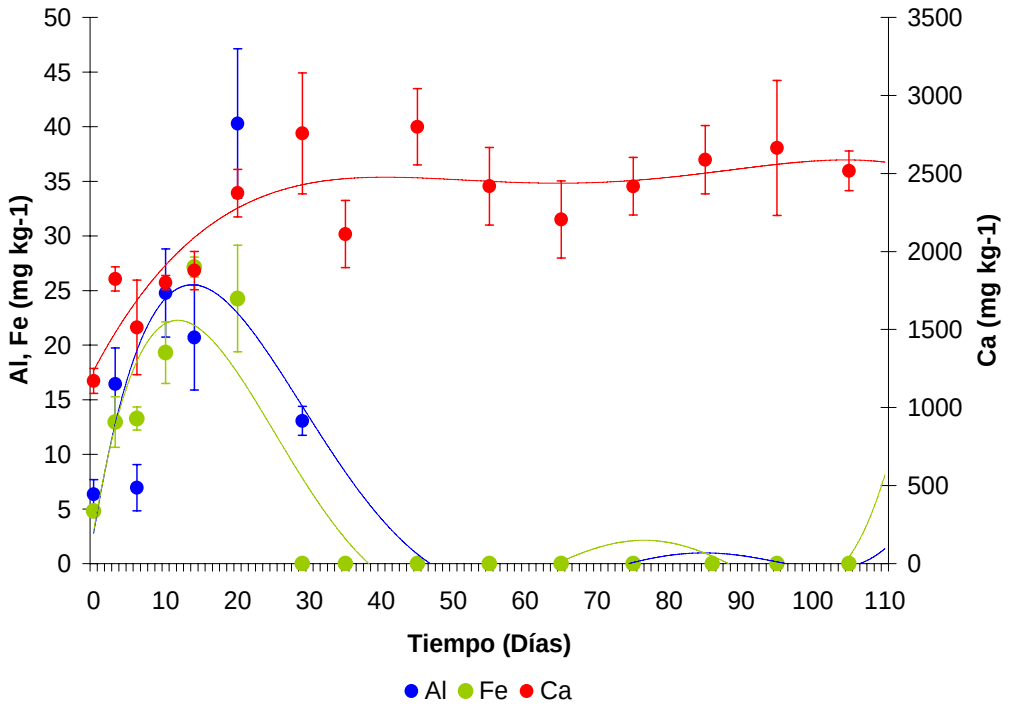


Figura 4.4. Dinámica de los iones de intercambio, Ca, Al y Fe, durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino.

4.2.4. Distribución de las fracciones de fósforo.

La variación de Pi, de Po y de P-residual en las distintas fracciones de P, se muestra en la Figura 4.5. Se observó que el Pi fue predominante en la excreta de bovino y estuvo en el rango de 37 a 58%, excepto en el día inicial donde el porcentaje de Po fue similar y alcanzó un 38%. Por otra parte, se observó que el porcentaje de Po decreció en el tiempo con un alto grado de correlación (r = -0,948, $P \leq 0,05$) con el incremento de la fracción P-residual desde 23 a 53%. Leinweber et al., (1997) reportaron que la fracción de P-residual en purines de cerdo, puede alcanzar un 39%, en tanto que en purines de ave esta fracción puede llegar hasta 51%. Las formas de P en la fracción residual no se encuentran completamente definidas y en general, se hace referencia a una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos de P (Toor et al., 2006). No obstante que, existen estudios de P en residuos orgánicos donde se ha considerado que la fracción de P-residual esta constituida por compuestos orgánicos recalcitrantes (Ajiboye et al., 2004).

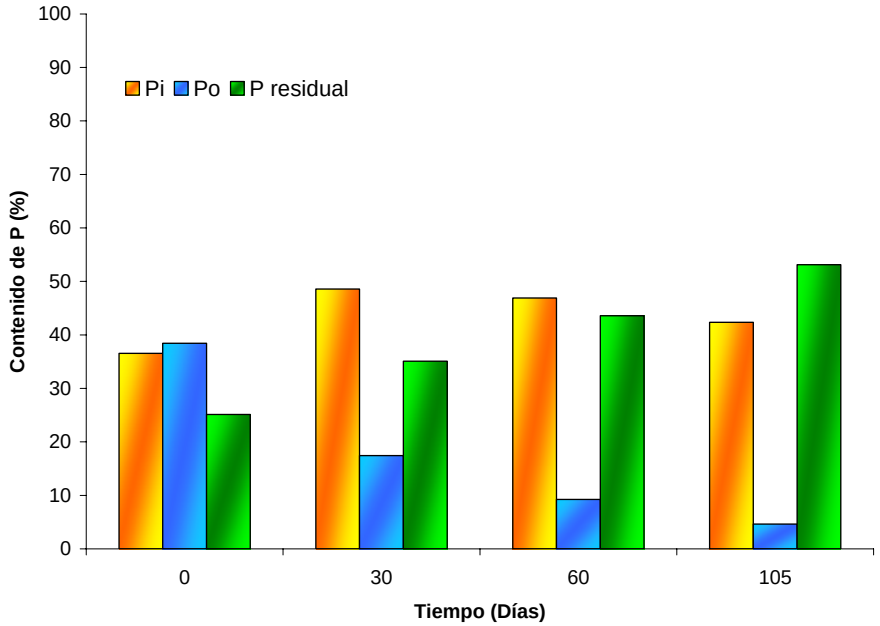


Figura 4.5. Variación porcentual de Pi*, Po** y P-residual durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. * $P_i = P_i\text{-}H_2O + P_i\text{-}NaHCO_3 + P_i\text{-}NaOH + P_i\text{-}HCl$; **$P_o = P_o\text{-}H_2O + P_o\text{-}NaHCO_3 + P_o\text{-}NaOH + P_o\text{-}HCl$

En excretas y en purines se ha comprobado que el P inorgánico se encuentra en mayor proporción que el P orgánico. El P inorgánico en excretas y en purines constituye entre un 60 y un 90% del P total (Haynes y Williams, 1993; Ajiboye et al., 2004; Hansen et al., 2004; McDowell y Stewart, 2005). Frossard et al., (2002) indicaron que en diferentes compost de purines, el P total varía entre 3440 y 3950 mg kg^{-1}, con valores de P inorgánico entre 2150 y 2260 mg kg^{-1}, respectivamente. He et al., (2003a) y Hansen et al., (2004) indicaron que en purines, aproximadamente un 70% del P inorgánico forma compuestos tales como: fosfatos, polifosfatos y precipitados de Fe, Ca, Al y Mg, los cuales son de baja disponibilidad. Por otra parte, He y Honeycutt (2001) determinaron que la concentración del P total en purines de cerdo y de bovino, puede alcanzar valores de 3875 y 3450 mg kg^{-1} indicando, que entre un 49 y un 44% corresponde a P orgánico, respectivamente. Ajiboye et al., (2004) indicaron que en purines de bovino el P orgánico puede constituir un 50% del P total.

Durante la degradación de la excreta de bovino, la concentración de P total incrementó en promedio, desde 3770 hasta 8770 mg kg^{-1}, como resultado de la disminución de la materia seca del reactor desde 2 kg hasta 0,9 kg, lo que se debió fundamentalmente a la pérdida de compuestos volátiles de carbono, nitrógeno y azufre durante la mineralización de la materia orgánica. Considerando que los purines permanecen en pozos abiertos en la mayoría de los predios agrícolas, las pérdidas de estos gases constituyen una fuente de emisión de gran importancia en el proceso del calentamiento global de la atmósfera.

El detalle del fraccionamiento, que incluye los contenidos de Pi y de Po en cada fracción, se presenta en la Tabla 4.2. Se observó que el Pi fue predominante en la fracción P-H_2O (alrededor de 23%) y no se registró una variación significativa porcentual durante el periodo de degradación. Sin embargo, se registró un aumento significativo de Pi ($P \leq 0,05$) en la fracción P-$NaHCO_3$ (de 7 a 14%). Al contrario el contenido de Po disminuyó significativamente ($P \leq 0,05$) en ambas fracciones; por lo tanto, es posible que exista una asociación entre el aumento de Pi en la fracción P-$NaHCO_3$ y la mineralización de Po desde ambas fracciones que son consideradas disponibles. Estudios realizados por He et al., (2004a) en distintos purines de bovino, indican que el Pi de la fracción P-H_2O varía entre un 12 y un 44% del P total del purín y que el Po de la misma fracción varía entre un 2 y un 23% del P total del purín; análogamente, han informado que el Pi y de Po de la fracción $NaHCO_3$ puede variar entre un 4 y un 44% y entre un 2 y un 27% del P total del purín, respectivamente. Adicionalmente, se ha reportado el predominio de Pi por sobre Po en la fracción P-H_2O (McDowell y Stewart, 2005; He et al., 2004a).

En las fracciones P-NaOH y P-HCl, se registraron bajos contenidos de Pi, los cuales fueron menores al 7% del P total. En la fracción P-NaOH se determinó un aumento significativo ($P \leq 0,05$) de Pi en el tiempo desde 3 a 6%. Por otra parte, en las fracciones P-NaOH y P-HCl, se observó un decrecimiento significativo del Po ($P \leq 0,05$) desde un 14 a un 1% y desde un 6 a un 1%, respectivamente. Los estudios realizados por He et al., (2006) demostraron la existencia de Po en la fracción P-HCl, y determinaron que en dicha fracción la concentración de Po puede llegar a ser el doble que la concentración de Pi. El decrecimiento del Po en ambas fracciones mostró correlación ($P \leq 0,01$) con el incremento

de P residual; el coeficiente de correlación entre el P-residual y el Po-NaOH fue de r: -0,897; y entre P-residual y Po-HCl fue de r: -0,940. En base a estas observaciones, se plantea que los procesos asociados con el aumento de P residual tienen relación con la transformación de Po a especies menos disponibles; los procesos involucrados podrían incluir la polimerización de la materia orgánica, el rearreglo estructural de las macromoléculas húmicas y la formación de fosfatos calcio, principalmente.

Los resultados obtenidos en el fraccionamiento de P (Tabla 4.2), dejan en evidencia que los cambios físico-químicos y biológicos ocurridos durante el proceso de degradación aeróbica de la excreta de bovino, influyen en la distribución de las fracciones de P, los cuales generan un incremento de la fracción P-residual que fue relacionado principalmente con la disminución del Po de las fracciones P-NaOH y P-HCl.

Tabla 4.2. Fraccionamiento secuencial de P, realizado durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino. Pi, Po y P-residual (mg kg^{-1}) en las distintas fracciones de P.

Tiempo	Pi, Po y P-residual (mg kg^{-1}) en las distintas fracciones de P									Σ P**
Día	Pi-H_2O	Po-H_2O*	Pi-$NaHCO_3$*	Po-$NaHCO_3$*	Pi-NaOH*	Po-NaOH*	Pi-HCl*	Po-HCl*	P- Residual *	(mg/kg)
0	956 ± 25	120 ± 5	267 ± 16	577 ± 30	101 ± 5	540 ± 11	53 ± 6	210 ± 16	946 ± 33	3770± 280
	(25)	(3)	(7)	(15)	(3)	(14)	(1)	(6)	(25)	
30	1661 ± 99	404 ± 33	1048 ± 57	162 ± 11	374 ± 29	358 ± 3	149 ± 5	215 ± 10	2017 ± 148	6388± 603
	(26)	(6)	(17)	(3)	(6)	(6)	(2)	(3)	(32)	
60	1762 ± 100	191 ± 8	1127 ± 80	146 ± 16	408 ± 27	196 ± 13	150 ± 3	200 ± 8	3192 ± 294	7372± 825
	(24)	(3)	(15)	(2)	(5)	(3)	(2)	(3)	(43)	
105	2000 ± 81	156 ± 8	1231 ± 61	73 ± 7	413 ± 9	105 ± 6	179 ± 15	85 ± 3	4537 ± 98	8779±1008
	(23)	(2)	(14)	(1)	(5)	(1)	(2)	(1)	(52)	

Materia seca promedio de los reactores 2,1; 1,24; 1,07 y 0,9 kg, los días 0, 30, 60 y 105, respectivamente.

Valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de P total calculado para cada día de degradación.

El símbolo (*) en una columna indica que existió diferencia significativa ($P \leq 0{,}05$) entre los distintos días de tratamiento para esa fracción.

El símbolo (**) indica que los cálculos fueron realizados con los valores promedio que aparecen en la tabla.

2.4.5. Actividad enzimática fosfatasa ácida y alcalina.

La actividad enzimática fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina determinada durante la degradación aerobia de la excreta de bovino, se muestra en la Figura 4.6. Se observó que en el día inicial, ambas actividades fueron similares; sin embargo, la actividad fosfatasa alcalina fue significativamente superior ($P \leq 0,05$) que la actividad fosfatasa ácida, en los días 30, 60 y 105, con valores que fluctuaron entre 185, 415 y 328 µmol ρ-nitrofenol g^{-1} h^{-1}. En cambio, la actividad fosfatasa ácida varió entre 18 y 200 µmol ρ-nitrofenol g^{-1} h^{-1}, cuantificándose los mayores valores tanto al inicio como al final del proceso de degradación de la excreta. Se ha demostrado que la actividad fosfatasa es variable durante la degradación de los residuos orgánicos (Vuorinen, 2000; Tiquia, 2002; Mondini et al., 2004). Estudios de Mondini et al., (2004) informaron baja actividad fosfatasa ácida, con valores entre 30 y 59 µmol ρ-nitrofenol g^{-1} h^{-1}, durante el compostaje de residuos orgánicos fácilmente biodegradables; al mismo tiempo que reportaron valores de actividad fosfatasa alcalina entre 132 y 169 µmol ρ-nitrofenol g^{-1} h^{-1}. Vuorinen, (2000) cuantificó la actividad fosfatasa durante el compostaje de purines y encontró que la mayor actividad fosfatasa alcalina se registró durante el primer mes de degradación y presentó valores máximos entre 75 y 100 µmol ρ-nitrofenol g^{-1} h^{-1}; en cambio, la actividad fosfatasa ácida registró mayores variaciones en el tiempo y registró valores máximos de 43 y 47 µmol ρ-nitrofenol g^{-1} h^{-1}.

Es importante destacar que la actividad enzimática es sensible a los cambios de pH, puesto que se provocan alteraciones conformacionales y químicas de los grupos funcionales de los aminoácidos esenciales para la acción catalítica. Por otra parte el pH puede influenciar la concentración de inhibidores o de activadores de la actividad enzimática y por último puede afectar la concentración del sustrato (Dick et al., 2000). La actividad fosfatasa alcalina, cuantificada en este estudio, mostró correlación con el pH del sistema (r: 0,70; $P \leq 0,05$). Por otra parte, las actividades de ambas enzimas no mostraron correlación con los parámetros asociados a la biomasa microbiana (temperatura, P biomásico o recuento de bacterias mesófilas). Estos resultados concuerdan con los estudios de Mondini et al., (2004) que indican que, las enzimas extracelulares liberadas por los microorganismos pueden inmovilizarse en los componentes húmicos generados durante el proceso de degradación de

la materia orgánica; lo que puede contribuir con un pool estable de enzimas extracelulares independientes de la biomasa microbiana cuya actividad se podría mantener por periodos prolongados de tiempo.

Adicionalmente, el decrecimiento del Po en la fracción bicarbonato mostró una correlación inversa con la actividad fosfatasa alcalina (r: -0,66; $P \leq 0,05$) en tanto que el Pi de la fracción agua, y el Pi de la fracción bicarbonato (r: 0,70; $P \leq 0,05$) mostraron correlación con la actividad fosfatasa alcalina. Lo anterior sugiere que la actividad fosfatasa alcalina podría mineralizar los compuestos orgánicos de P, presentes en las fracciones disponibles, generando un incremento del Pi disponible.

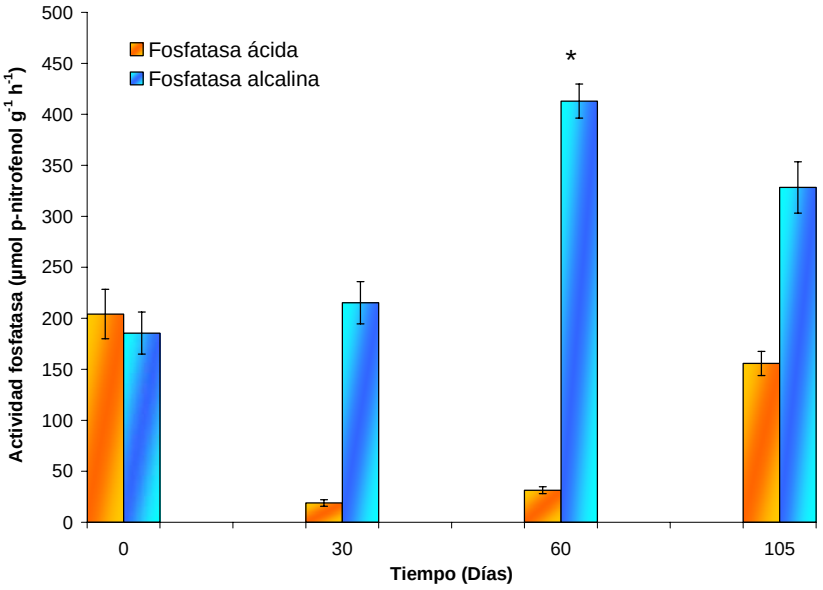


Figura 4.6. Variación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina, durante la degradación aerobia de la excreta de bovino. * Denota la principal diferencia significativa encontrada para fosfatasa alcalina ($P \leq 0,05$) en el tiempo.

4.2.6. Análisis de ^{31}P RMN.

Los espectros de ^{31}P RMN se muestran en la Figura 4.7. La intensa señal observada entre los 6,23 y 6,24 ppm fue asignada al ion fosfato; las señales entre 6,0 y 4,0 ppm fueron asignadas a los compuestos monoester fosfato; mientras que la señal en -4.21 ppm fue asignada a pirofosfato. No fue posible detectar compuestos diéster fosfato.

Basado en el método de comparación se estimó que, en el extracto de NaOH-EDTA, el P proveniente del ion fosfato fue de 1376 mg kg^{-1} en el día inicial y de 3731 mg kg^{-1} en el día 105, en tanto que el P proveniente de las especies monoester fosfato fue 351 mg kg^{-1} y 840 mg kg^{-1}, y que el P proveniente del pirofosfato fue 22 mg kg^{-1} y 6 mg kg^{-1}, los días 0 y 105, respectivamente. En general, se determinó que la concentración de Pi fue predominante en los extractos de NaOH-EDTA, seguido por la concentración de P proveniente de los compuestos monoester fosfato. Se han reportado concentraciones de P similares en excretas de bovino cuando se ha utilizado esta técnica. Resultados equivalentes fueron reportados por Leinweber et al., (1997); Turner (2004); McDowell y Stewart, (2005). Por ejemplo, se han determinado concentraciones de Pi del orden de 2187- 2307 mg kg^{-1}, concentraciones de P provenientes de la fracción monoester fosfato entre 319-599 mg kg^{-1} y concentraciones de P desde pirofosfato entre 71 y 108 mg kg^{-1} (McDowell y Stewart, 2005).

La rica composición de señales en la zona monoester fosfato indicó una gran variedad de estos compuestos en la excreta de bovino. Las señales indicaron la presencia de compuestos inositol fosfato, mononucleótidos, azúcar fosfato y otros compuestos generados durante la extracción con NaOH-EDTA (Turner, 2004). Es posible que los compuestos monoester y diester fosfato sean degradados durante el procedimiento de extracción, el proceso de tratamiento, almacenaje, (McDowell y Stewart 2005; Toor et al., 2005) ó en este caso, durante el proceso de degradación aerobia.

De acuerdo con la literatura, las señales exhibidas en 5,8; 5,1; 4,7 y 4,5 ppm fueron asignadas al ácido fítico (Maguirre et al., 2004; Turner, 2004; Toor et al., 2005). Aunque el

espectro fue poco resuelto en la zona monoester, se estimó la cantidad de P proveniente de este compuesto por medio de la señal en 5,85 ppm. Esta señal fue clara hasta el día 60 y se presentó como un hombro sobre la señal de fosfato, después decreció intensidad de la señal. Así, la fracción de P proveniente del ácido fítico fue 153 mg kg^{-1} (9 % de Pt en el extracto de NaOH-EDTA) el día 0 y 613 mg kg^{-1} (14% de Pt en el extracto de NaOH-EDTA) el día 60. Después en el día 105 la concentración de P proveniente de este compuesto fue de 72 mg kg^{-1} (1,6% de Pt en el extracto de NaOH-EDTA). Los valores de P proveniente del ácido fítico estimados en este ensayo, fueron más bajos que el valor reportado por Toor et al., (2005), correspondiente a 1325 mg kg^{-1}, extraído desde muestras de excreta de bovino. Hansen et al., (2004) determinaron que en excretas de bovino, el 15,6% del Pt en el extracto de NaOH-EDTA, proviene del ácido fítico. La disminución de la intensidad de la señal del ácido fítico, podría indicar que existió menor cantidad del compuesto en el extracto de NaOH-EDTA, lo cual podría sugerir que el ácido fítico se volvió más recalcitrante, o bien que fue degradado durante el proceso de degradación aerobia. El cambio del ácido fítico hacia la fracción de P residual, podría deberse a la formación de compuestos recalcitrantes con cationes polivalentes por medio de enlaces intra e inter moleculares que son difíciles de extraer (Turner et al., 2002b; Dao, 2003).

La formación de materiales orgánicos recalcitrantes y el incremento de compuestos de alto peso molecular originados por los procesos de humificación y de polimerización de la materia orgánica que ocurren durante el proceso de degradación (Huang et al., 2006; Lhadi et al., 2006), podrían tener un efecto sobre la transformación del ácido fítico hacia una fracción polimérica estable de carácter recalcitrante. Estas asociaciones serían similares a las fuertes interacciones que puede formar el ácido fítico con ácidos húmicos y fúlvicos del suelo (Borie et al., 1989). Por otra parte, la presencia de bacterias que utilizan fitato (mencionadas el punto 4.27) podría tener relación con la regulación de la concentración de ácido fítico.

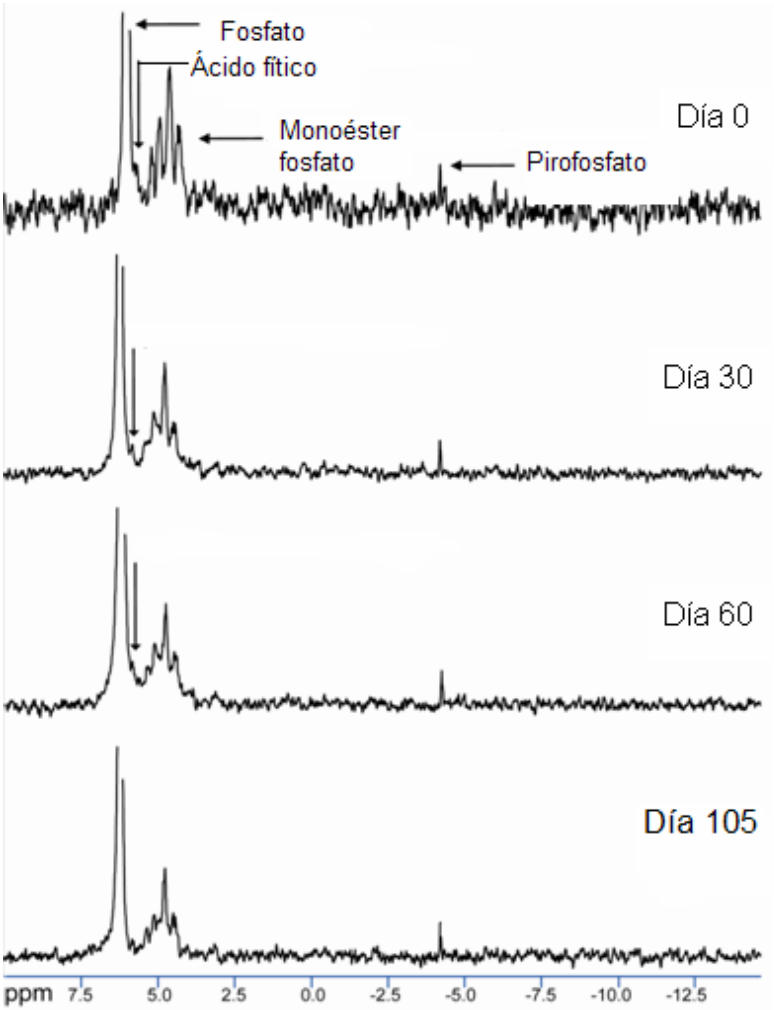


Figura 4.7. Espectros de ^{31}P resonancia magnética nuclear (RMN) de muestras de excreta de bovino, obtenidas durante el proceso de degradación aerobia.

4.2.7. Identificación y caracterización de bacterias que utilizan fitato (BUF), aisladas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino.

a) Estimación de bacterias mesófilas cultivables totales (BCT) y BUF.

El recuento de BCT y BUF se muestra en la Tabla 4.3. Se registró una leve disminución de las células bacterianas durante los primeros 15 días (desde 26 $\times 10^7$ hasta 40 x 10^6 CFU g^{-1}), posteriormente éstas recuperaron su número inicial, alcanzando 61$\times 10^7$ CFU g^{-1} en el día 95. El recuento de BCT mostró una correlación inversa con la temperatura (r = -0,7; $P \leq$

0,05), lo que indicó que las altas temperaturas generadas al inicio del proceso de degradación aerobia no favorecieron el desarrollo de bacterias mesófilas; sin embargo, estas condiciones podrían haber beneficiado el desarrollo de otros microorganismos, tales como bacterias termófilas y levaduras (Choi y Park, 1998; Hassen et al., 2001). Estudios bacteriológicos realizados por Jang et al., (2002) durante la degradación de residuos orgánicos, mostraron que el número de bacterias mesófilas decreció, desde 10^{10} a 10^{5}, durante los primeros 10 días, aumentando a 10^{8} después de los 30 días.

Tabla 4.3. Recuento de bacterias mesófilas cultivables totales (BCT) y de bacterias que utilizan fitato (BUF), durante la degradación aerobia de la excreta de bovino.

	----------Días de degradación----------							
	0	3	6	14	35	55	75	95
BCT ($\times 10^{7}$ CFU g^{-1})	25,5±1*	15,7±5	11,7±1	3,9±1	20,5±3	27,9±10	47,6±10	61±13
BUF † **(%)**	**57,9**	**24,2**	**25,4**	**35,9**	**7,8**	**5,3**	**54,4**	**49,2**
Morfotipo ‡ ***(%)***								
A	2,5	7,1	10,5	--	--	--	--	--
B	**46,4**	**59,8**	**50,0**	**2,7**	**16,7**	**34,6**	**57,1**	**74,6**
C	4,5	1,8	2,3	--	2,7	15,4	17,9	4,6
D	**35,0**	**31,3**	**37,2**	**20,1**	**80,6**	**50,0**	**25,0**	**20,8**
E	5,9	--	--	--	--	--	--	--
F	5,7	--	--	--	--	--	--	--
G	--	--	--	77,2	--	--	--	--

† Porcentaje de BUF respecto a BCT; ‡ Porcentaje de cada morfotipo de BUF respecto a BUF totales; --: no detectados.

Con respecto al porcentaje de BUF, se pudo observar un decrecimiento constante entre los días 0 y 55, desde 58 a 5% (Tabla 4.3); luego el porcentaje incrementó, alcanzando un 54 y un 50% en los días 75 y 95, respectivamente. La variación de los morfotipos de BUF encontrados durante el proceso de degradación aerobia, se muestran en la Tabla 4.3. La mayor diversidad de BUF se observó en el día inicial de degradación, donde se aislaron 6

morfotipos (A, B, C, D, E y F) (ver fotografías en ANEXO 1). La abundante cantidad y diversidad de BCT y BUF que se registró al inicio del proceso de degradación, fue asociado con la microflora nativa del tracto digestivo del ganado bovino (Yanke et al., 1998). La presencia y predominancia de los morfotipos de BUF fue cambiando en el tiempo; en el día 95 se observó sólo la presencia de 3 morfotipos (B, C y D).

Los morfotipos B y D estuvieron presentes a lo largo de todo el proceso de degradación y finalmente se hicieron predominantes en relación al número total de BUF, alcanzando 75% y 21%, respectivamente. Por otra parte, los aislados bacterianos B y D, mostraron una capacidad estable y eficiente para utilizar fitato sobre medio agar, comparado con los otros morfotipos que perdieron su capacidad utilizadora de fitato después de continuas transferencias en placa. Adicionalmente, se observó correlación ($r = 0{,}93$ $P \leq 0{,}05$) después del día 30, entre el porcentaje de BUF y el incremento de la fracción de P-residual. Esto sugirió que la baja disponibilidad de P al final del proceso de degradación puede favorecer el desarrollo y el dominio de poblaciones bacterianas con mecanismos para obtener P desde compuestos de baja disponibilidad, como el fitato.

b) Caracterización de BUF.

El resultado del análisis del gen 16S rDNA de los aislados bacterianos pertenecientes a los distintos morfotipos de BUF, obtenidos durante la degradación de la excreta, se muestra en la Tabla 4.4. Las BUF caracterizadas fueron asociadas con miembros pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae*, *Streptomycetaceae*, *Brucellaceae* y *Bacillaceae*. La identificación genética indicó que los aislados de los morfotipos B y D pertenecieron a los géneros *Enterobacter* y *Rahnella*, respectivamente. En la Figura 4.8 se muestran ambos aislados bacterianos, y el halo de decoloración sobre el medio agar que se produjo debido a la utilización de fitato. Diversos estudios han informado sobre la capacidad de *Enterobacter* para solubilizar fitato (Kang et al., 2006; Herter et al., 2006; Jorquera et al., (2008a) y para solubilizar fosfatos de Ca, Al y Fe (Chung et al., 2005; Jorquera et al., 2008a). La capacidad de *Rahnella aquatilis* para solubilizar hidroxiapatita fue previamente reportada por Kim et al., (1997).

Complementariamente en la Tabla 4.4, se indica la capacidad de los aislados bacterianos para solubilizar fosfato de calcio. Se observó que la mayoría de los aislados presentaron capacidad dual para utilizar tanto fitato como fosfato de calcio, en placas con medio agar, con la excepción de *Ochrobactrum* y *Bacillus* que sólo utilizaron fitato. Es importante destacar la eficiente capacidad de los aislados *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-95, para utilizar fitato y para solubilizar fosfato de Ca.

Tabla 4.4. Identificación genética de las bacterias que utilizan fitato (BUF), aisladas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino.

Identificación aislado	**P - utilización [†] (fitato/fosfato)**	**Género [††]**	**Número acceso**
B-00[a]	(++/++)	*Enterobacter*	EU046496
D-00	(++/++)	*Rahnella*	EU046497
E-00	(+/+)	*Escherichia*	EU046498
F-00	(+/+)	*Shigella*	EU046499
A-03	(+/+)	*Streptomyces*	EU046500
B-03	(++/++)	*Enterobacter*	EU046501
C-03	(+/-)	*Ochrobactrum*	EU046502
D-03	(++/++)	*Rahnella*	EU046503
G-14	(+/-)	*Bacillus*	EU046504
B-32	(++/++)	*Enterobacter*	EU046505
B-75	(++/++)	*Enterobacter*	EU046506
D-75	**(++/++)**	***Rahnella***	**EU046507**
B-95	**(++/++)**	***Enterobacter***	**EU046508**
C-95	(+/+)	*Ochrobactrum*	EU046509

[†] Capacidad de los aislados para utilizar fitato y solubilizar fosfato de calcio.

[††] Géneros obtenidos en base a la secuenciación parcial del gen 16S rDNA y la comparación con la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI)

[a] Indica el día en el cual fue asilada la bacteria. La escala cualitativa, se basa en el diámetro del halo de decoloración en el agar. ++: Halo de decoloración > 0,5 cm de diámetro; +: halo de decoloración entre 0,2 y 0,5 cm de diámetro; -: no se observó el halo de decoloración.

Adicionalmente, con la prueba API ZYM se detectó que los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp.D-75, presentan actividad fosfatasa ácida, fosfatasa

alcalina y fosfohidrolasa. Estudios realizados por Jorquera et al., (2008b), utilizando la prueba API ZYM, demostraron que bacterias mineralizadoras de fitato y bacterias solubilizadoras de fosfato de calcio, aisladas desde la rizósfera de especies pratenses, muestran actividad fosfatasa ácida, alcalina y fosfohidrolasa.

Debido a que los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75 resistieron diferentes condiciones fisicoquímicas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino; además, presentaron estable capacidad y eficiencia para utilizar fitato y fosfato de Ca y presentaron actividad enzimática fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y fosfohidrolasa; se sugiere que los géneros bacterianos *Enterobacter* y *Rahnella* podrían ser estudiados con el fin de mejorar la disponibilidad de P en residuos orgánicos y en suelos.

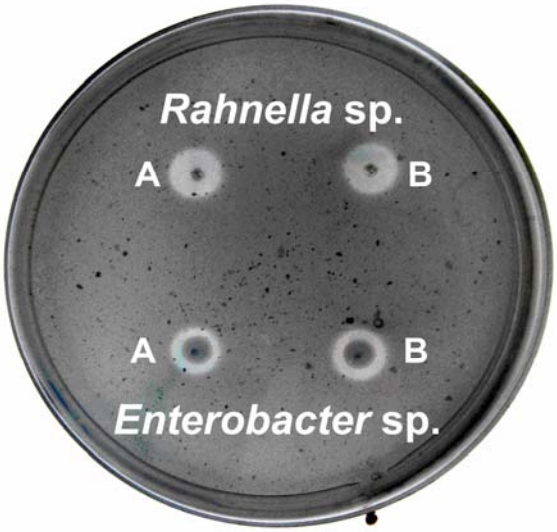


Figura 4.8. Bacterias que utilizan fitato (BUF), aisladas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino.

4.3. Incubación de BUF en la excreta de bovino degradada (EBD).

La dinámica del Pi liberado desde la EBD, en presencia de los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75 se muestra en la Figura 4.9. A partir del segundo día de incubación y en presencia de ambos aislados bacterianos se detectó un leve incremento en la concentración del Pi con respecto al control. La mayor liberación de Pi, en

presencia de los aislados bacterianos, se registró entre los días 7 y 8, con valores promedio de 2100 mg kg^{-1}, posteriormente la concentración del Pi decreció hasta valores de 1800 mg kg^{-1}. En el séptimo día de incubación, el incremento de Pi con respecto al control, fue de un 27% (455 mg kg^{-1}) en presencia de *Enterobacter* sp. B-95 y de un 22% (375 mg kg^{-1}) en presencia de *Rahnella* sp. D-75, no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0{,}05$) entre ellos. Estudios de Joen et al., 2003, encontraron que la máxima solubilización de fosfato de calcio e hidroxiapatita en presencia de *Pseudomonas fluorescens* y de *Bacillus megaterium,* se produce después de cinco días de incubación.

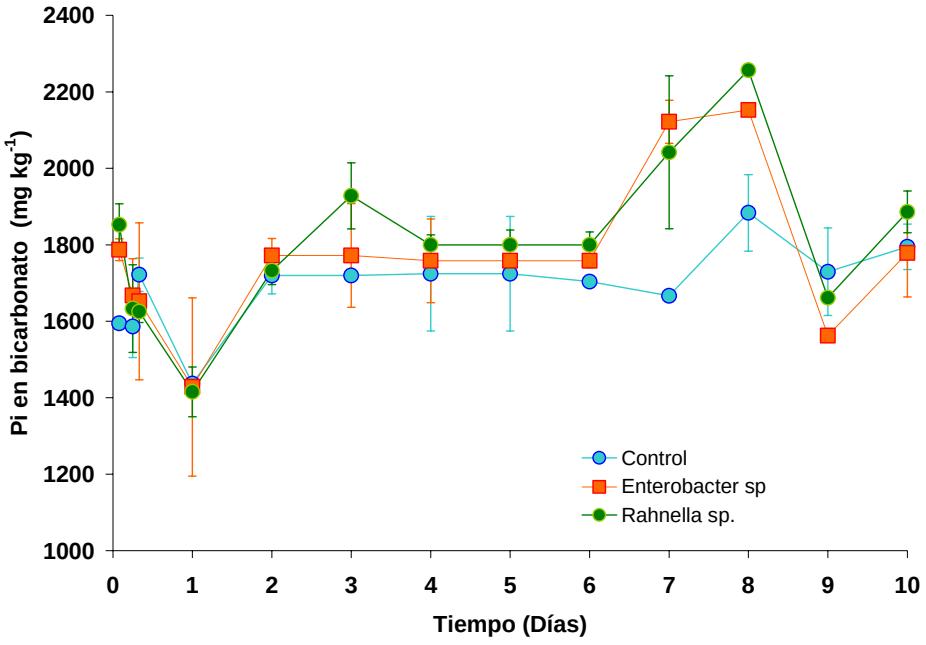
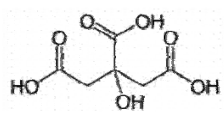


Figura 4.9. Pi liberado desde la excreta de bovino degradada (EBD), en presencia de los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75.

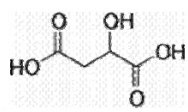
Con el experimento realizado se comprobó que los aislados bacterianos efectivamente producen un incremento del Pi disponible en la EBD. Los mecanismos involucrados pueden ser múltiples y simultáneos, estos pueden incluir la mineralización de fitato y de otros compuestos monoéster fosfato y la solubilización de fosfatos de calcio. Los resultados obtenidos confirman que ambos aislados bacterianos incrementan la disponibilidad de P en la EBD.

4.4. Aplicación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en la excreta de bovino degradada (EBD).

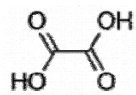
Tanto las plantas como los microorganismos utilizan diversas estrategias para incrementar la captación de P desde el suelo. Una estrategia muy utilizada para la movilización de P inorgánico es la exudación de AO de bajo peso molecular. En este estudio, se utilizaron los ácidos cítrico, málico, oxálico y glucónico (Figura 4.10), para inducir la liberación de Pi desde la EBD.



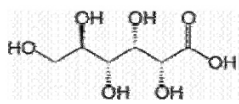
Ácido cítrico
pK: 3,13; 4,76 y 6,39



Ácido málico
pK: 3,46; y 5,09



Ácido oxálico
pK: 1,25 y 4,27



Ácido glucónico
pK: 3,86

Figura 4.10. Ácidos orgánicos utilizados para inducir la liberación de Pi desde la excreta de bovino degradada (EBD).

4.4.1. Cinética de liberación de fósforo en presencia de ácidos orgánicos.

La incorporación de los AO en la EBD incrementó la liberación de Pi, con respecto a la EBD control (Figura 4.11). Los estudios cinéticos, indicaron que el tiempo de equilibrio, para la liberación de Pi, se alcanzó a las 16 horas en presencia ó en ausencia de los AO. Para describir la cinética de liberación de Pi, se utilizó la ecuación de Elovich, que representa con un alto grado de ajuste los procesos de adsorción y desorción de P en suelos y en residuos orgánicos (Toor y Bahl, 1999; Mezenner y Bensmaili, 2008). Los resultados mostraron (parámetro α, Tabla 4.5) un incremento de la velocidad inicial de liberación de Pi, con respecto a la EBD control, en presencia de cualquiera de los AO estudiados. La velocidad de liberación de Pi fue mayor cuando se utilizó ácido cítrico y decreció en el siguiente orden: ácido cítrico > ácido málico > ácido glucónico > ácido oxálico.

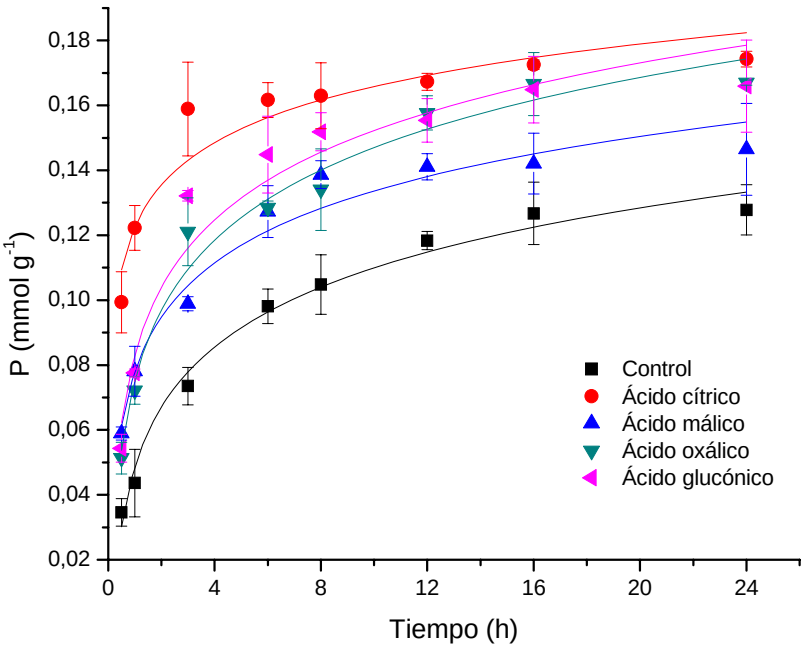


Figura 4.11. Cinética de liberación de Pi desde la excreta de bovino degradada (EBD), en presencia de ácidos orgánicos.

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Elovich, para describir la liberación de Pi desde la excreta de bovino degradada (EBD) en presencia de ácidos orgánicos.

Parámetros	**EBD control**	**EBD + Ácido cítrico**	**EBD + Ácido málico**	**EBD + Ácido oxálico**	**EBD + Ácido glucónico**
α (mmol P g^{-1} h^{-1})	0,16	12,26	0,61	0,35	0,48
β (mmol P g^{-1})$^{-1}$	37	53	41	32	33
R^2	99	91	97	98	95

α: Velocidad inicial de liberación de Pi. β: Constante de liberación de Pi.

En el equilibrio la liberación de Pi incrementó respecto a la EBD control (Figura 4.12), en 36%, 31% y 30% cuando se aplicaron los ácidos cítrico, oxálico y glucónico, respectivamente; sin embargo, no se registraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$). Con la

aplicación de ácido málico la liberación de Pi se incrementó sólo en un 12%, con respecto a la EBD control.

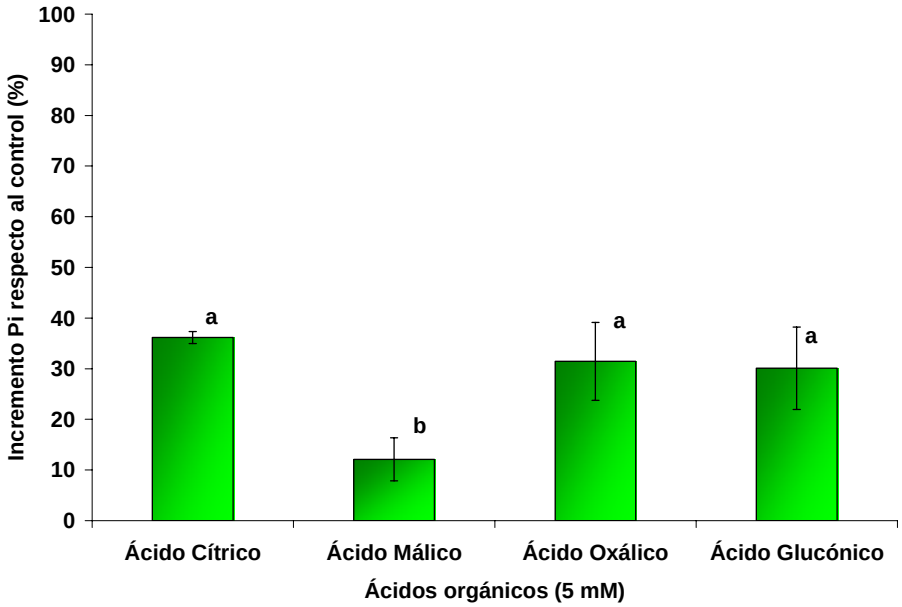


Figura 4.12. Incremento de liberación de Pi desde la EBD, con respecto a la EBD control, utilizando ácidos orgánicos (determinaciones realizadas a las 16 h). Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0{,}05$).

Se ha demostrado que los ácidos cítrico, oxálico y málico pueden liberar P desde óxidos puros, sintéticos ó naturales, y desde suelos o desde componentes del suelo, por medio de intercambio de ligandos; por esta razón, se ha planteado que la efectividad de los AO, como agentes desorbentes de P, tendría relación con el número de grupos carboxilos presentes en la molécula (Bolan et al., 1994; Haynes y Mokolobate, 2001; Hinsinger, 2001; Kpomblekou-A y Tabatabai, 2003). En este estudio, se observó que el ácido cítrico (ácido tricarboxílico) liberó mayor cantidad de Pi comparado con el ácido oxálico y con el ácido málico (dicarboxílicos), aunque no existió diferencia significativa ($P \leq 0{,}05$) entre el ácido cítrico y el ácido oxálico. Por otra parte, la aplicación de ácido glucónico (ácido monocarboxílico), presentó una efectividad similar al ácido oxálico. Los resultados de este estudio no mostraron una clara relación entre la liberación de Pi desde la EBD y el número de grupos carboxilos de los AO. Esto podría indicar que la liberación de Pi debido a la

aplicación de AO es el resultado de diversos mecanismos, los que pueden incluir, la disolución de los fosfatos minerales; la complejación de cationes como el Ca, el Al y el Fe; la competencia por los sitios de adsorción y el desplazamiento de grupos fosfato desde la superficie, por medio de intercambio de ligandos (Bolan et al., 1994; Bhatti et al., 1998; Geelhoed et al., 1999; Hinsinger, 2001; Ström et al., 2002). Estudios de Batthi et al., (1998) y de Kpomblekou-A y Tabatabai, (2003) indicaron que la liberación de P desde superficies naturales y/o sintéticas, originada tanto por el ácido cítrico como por el ácido oxálico, se relaciona con la facilidad que poseen ambos ácidos para formar enlaces mono o bidentados con los constituyentes de la superficie. En cambio se ha reportado que el ácido málico tiende a formar enlaces monodentados, lo cual le genera una menor efectividad para liberar P, comparado con otros ácidos tri y di carboxílicos (Geelhoed at al., 1999; Hinsinger, 2001; Jones et al., 2003). Por otra parte, estudios de Kim et al., (1997); Lin et al., (2006) y Delvasto et al., (2008) han demostrado que el ácido glucónico presenta efectividad para solubilizar fosfatos; incluso, se ha reportado que la solubilización bacteriana de roca fosfórica y de fosfatos de calcio, estaría asociada con la acidificación que produce el ácido glucónico (Kim et al., 1997; Chen et al., 2006; Lin et al., 2006). Por otra parte, la EBD contiene distintos aniones, cationes y grupos orgánicos potencialmente intercambiables que pueden interaccionar con los ácidos orgánicos adicionados y provocar una disminución de la liberación de Pi. Así por ejemplo, los ácidos orgánicos se pueden intercambiar, mediante el mecanismo de intercambio de ligandos, no sólo con fosfato, si no también con otros aniones inorgánicos como el sulfato, y con aniones orgánicos constituyentes de la materia orgánica de la EBD, lo cual podría disminuir la eficacia del ácido para liberar Pi.

Los aniones orgánicos de los ácidos respectivos, interaccionan con los cationes presentes en la solución; mediante la formación de complejos y de precipitados, lo cual disminuye las interacciones entre el Pi y los cationes intercambiables. Mediante la especiación química realizada, utilizando el programa GEOCHEM, se determinó que los aniones citrato, malato y oxalato forman complejos con los iones Ca, Mg, Mn, y Al, liberados desde la EBD (Tabla 4.6). En presencia de ácido cítrico (que provocó una variación de pH entre 5,5 y 5,8) y de ácido oxálico (que generó una variación de pH entre 5,5 y 7,4) sobre el 80% de cada catión presente en solución, podría formar complejos con citrato y con oxalato. Es importante

destacar que, en presencia de oxalato un 12 % del Ca en solución, podría precipitar como oxalato de calcio, el cual tiene baja solubilidad (0,0067 g L^{-1}). En cambio, se observó que el malato (que originó una variación de pH entre 5,5 y 7,0) presentó menor interacción con los cationes de la EBD; menos del 20% del Ca y del Mg y cerca del 30% del Mn en solución podrían formar complejos con malato. En el caso del ácido glucónico (que origino una variación de pH entre 5,5 y 6,2), también se podría esperar la formación de complejos metálicos (Sawyer, 1964).

Tabla 4.6. Cationes de la excreta de bovino degradada (EBD) que forman complejos con citrato, malato y oxalato. Porcentaje del catión en solución que forma complejos con los ligandos orgánicos (%).

	Citrato		**Malato**		**Oxalato**	
pH*	5,5	5,8	5,5	7,0	5,5	7,4
Ca^{2+} (%)	85	89	17	17	82	82
Mg^{2+} (%)	82	86	11	12	82	82
Mn^{2+} (%)	90	93	28	30	94	94
Al^{3+} (%)	100	100	--	--	--	--

--:No se registró interacción.

*: Rango de pH registrado durante la cinética de liberación de Pi

Estudios de Ström et al., (2005) realizados en suelos alcalinos, mostraron que en presencia de ácido oxálico disminuye la concentración de Ca en solución; además, demostraron que la formación de complejos órgano-metálicos, contribuye a mantener el P disponible, debido a que se evita la reprecipitación del P con los cationes presentes en el sistema. Desde este punto de vista, se plantea que la mayor interacción de citrato y de oxalato con los cationes favorecería la permanencia de Pi en solución, en cambio la menor interacción entre malato y los cationes podría favorecer la reprecipitación de Pi. Estudios similares realizados por Yamamura et al., (2004) en lodos de plantas de tratamiento de aguas servidas, demostraron

que el ácido cítrico produce la disolución de fosfatos insolubles y quela los metales, lo cual genera un incremento de P disponible.

4.4.2. Liberación de Pi desde la EBD en presencia de distintas dosis de ácidos orgánicos.

La liberación de Pi desde la EBD en relación a la cantidad de AO aplicado, se muestra en la Tabla 4.7. En todos los casos, la liberación de Pi incrementó con la cantidad de AO adicionado. Los mayores incrementos de Pi se registraron cuando se aplicó ácido cítrico en dosis de 2,8 y 5,6 mmol ácido g^{-1} EBD, aunque entre ambas dosis el incremento de Pi no fue significativo ($P \leq 0,05$). Con la aplicación de dosis de ácido cítrico menores a 1,4 mmol g^{-1} EBD no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre dosis. Un comportamiento similar en cuanto a la liberación de Pi, pero en menor magnitud, se observó con la aplicación de los otros AO. Con la aplicación de dosis de 2,8 mmol ácido g^{-1} EBD de ácido cítrico, glucónico, oxálico y málico, se incrementó la liberación de Pi en un 40%, 21%, 17% y 15% con respecto a la EBD control, respectivamente. Adicionalmente, se determinó que la liberación de Pi por efecto del ácido cítrico fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$) que la liberación de Pi inducida por el ácido málico, oxálico y glucónico, a igual dosis de aplicación. En general, no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en la liberación de Pi, cuando se utilizaron las mismas dosis de los ácidos málico, oxálico y glucónico.

Estudios de Gerke et al., (2000) señalan que el ácido cítrico y el ácido oxálico presentan gran habilidad para movilizar P desde el suelo comparado con el ácido málico. Ishikawa et al., (2002) por su parte demostraron que la aplicación de AO en el suelo favorece la liberación de P y la efectividad de liberación de P incrementa en el siguiente orden: ácido cítrico > málico > succínico. Estudios de liberación de Pi en presencia de AO, desde suelos calcáreos realizados por Ström et al., (2005) mostraron que la liberación de P es mayor en presencia del ácido cítrico y del ácido oxálico, comparado con el ácido málico. Además indicaron que la liberación de P, incrementa a medida que se aumenta la dosis de aplicación de AO.

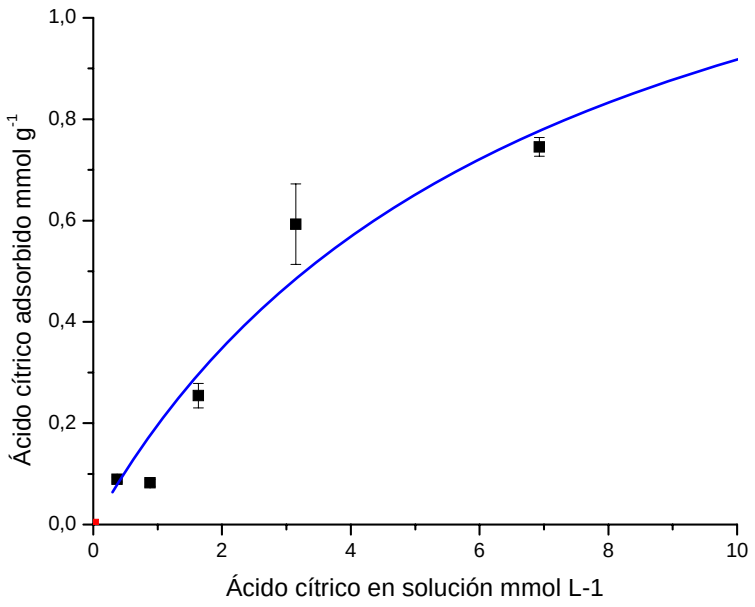
Tabla 4.7. Liberación de Pi, desde la excreta de bovino degradada (EBD), en relación a la dosis de ácido orgánico aplicado.

	Pi liberado (mmol g^{-1} EBD)			
Ácido orgánico (mmol g^{-1}EBD)	**EBD + Ácido cítrico**	**EBD + Ácido málico**	**EBD + Ácido oxálico**	**EBD + Ácido glucónico**
0,0	0,131 c	0,131 c	0,130 d	0,132 d
0,3	0,148 c	0,136 cb	0,129 cd	0,134 d
0,7	0,154 c	0,130 c	0,139 bc	0,139 cd
1,4	0,170 b	0,144 b	0,139 bc	0,150 bc
2,8	0,183 ab	0,151 ab	0,154 ab	0,159 ab
5,6	0,188 a	0,164 a	0,165 a	0,166 a

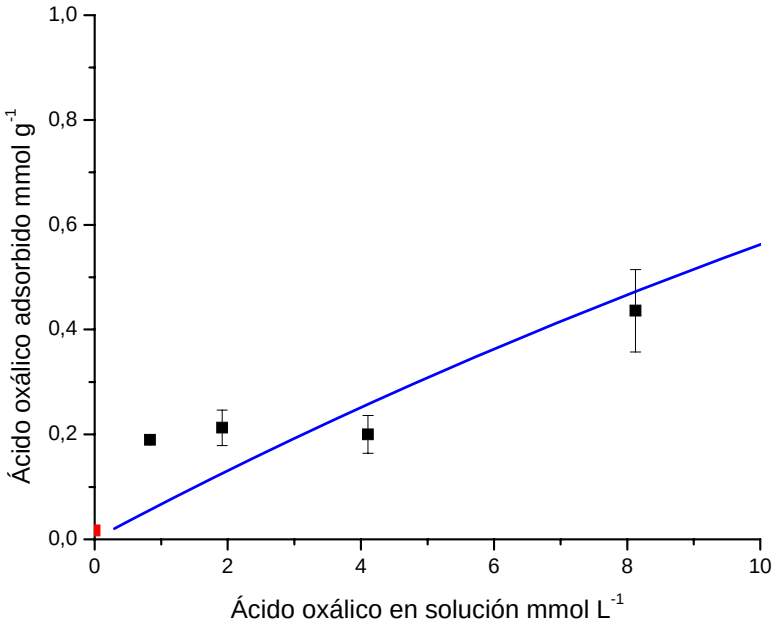
Letras distintas, indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre dosis de cada ácido orgánico. Las desviaciones estándar de los datos no superaron el 5%.

4.4.3. Isotermas de adsorción de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada.

En las Figuras 4.13 y 4.14, se muestran las isotermas de adsorción de los AO en la EBD. Las isotermas de adsorción del ácido cítrico y del ácido oxálico no presentaron un "plateau" estricto, lo que sugiere que no se presenta una saturación de sitios de adsorción. Por el contrario, en las isotermas de adsorción del ácido málico y del ácido glucónico, se observa un "plateau" estricto, lo cual sugirió que ambos AO presentaron una limitada capacidad de adsorción sobre la EBD. Las isotermas de adsorción de los AO fueron modeladas con las ecuaciones empíricas de Freundlich y Langmuir; cuyas constantes, se muestran en la Tabla 4.8. De acuerdo con el valor de los coeficientes de regresión (R^2), los datos experimentales se ajustaron mejor al modelo de Langmuir. El valor de la constante x_m de la ecuación de Langmuir, sugiere que el ácido cítrico presenta la mayor capacidad de adsorción (1,42 mmol g^{-1}) seguido por el ácido oxálico (0,55 mmol g^{-1}); en cambio, el ácido málico y el ácido glucónico presentarían una menor capacidad de adsorción (x_m: 0,33 mmol g^{-1}).

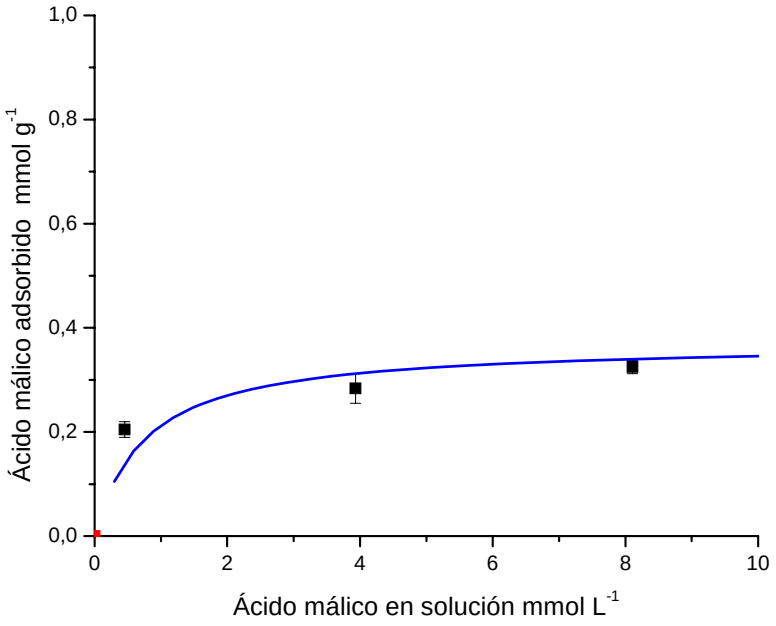


(a)

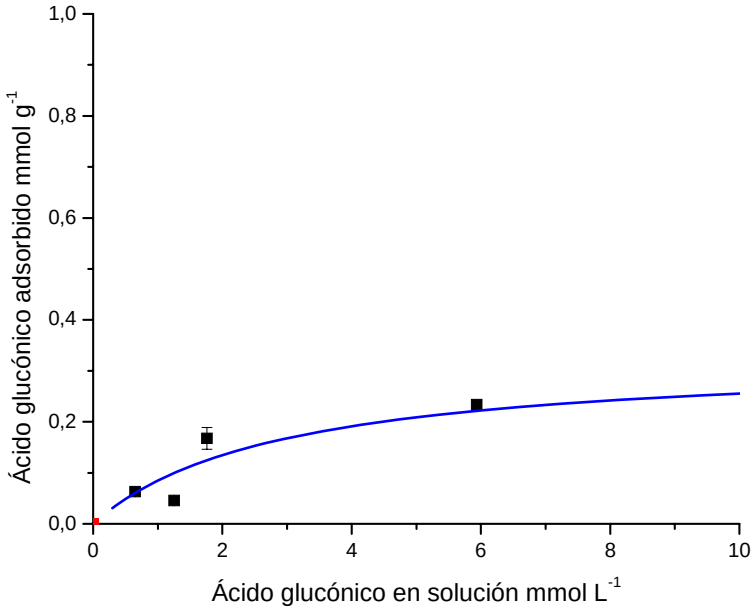


(b)

Figura 4.13. Isotermas de adsorción de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD), ácido cítrico (a) y ácido oxálico (b).



(a)



(b)

Figura 4.14. Isotermas de adsorción de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD), acido málico (a) y ácido glucónico (b).

Tabla 4.8. Coeficientes de la ecuación de Freundlich y de Langmuir para la adsorción de ácidos orgánicos en la excreta de bovino degradada (EBD).

	Ácidos			
Parámetros	**Cítrico**	**Málico**	**Oxálico**	**Glucónico**
		Freundlich		
a	0,16	0,23	0,17	0,09
1/b	0,86	0,15	0,31	0,57
R^2	0,88	0,90	0,61	0,89
		Langmuir		
x_m	1,42	0,33	0,55	0,33
k	0,16	2,2	0,44	0,44
R^2	0,83	0,90	0,96	0,96

a: capacidad relativa de adsorción; 1/b: constante de afinidad; k: constante de equilibrio; x_m: capacidad máxima de adsorción.

La adsorción de los ácidos orgánicos sobre la EBD, puede inducir la liberación de P por medio del mecanismo de intercambio de ligandos o por el bloqueo de los sitios de adsorción de P. De acuerdo con la forma de la isoterma del ácido cítrico y del ácido oxálico, ambos presentarían un comportamiento similar de adsorción; aunque el ácido cítrico tiene mayor capacidad para liberar P. De acuerdo con la especiación química realizada (Tabla 4.7), se podría plantear que parte del ácido oxálico se encuentra precipitado como oxalato de calcio y no adsorbido, lo que podría explicar la menor efectividad de este compuesto para liberar Pi desde la EBD. Por otra parte, se observó que tanto el ácido málico como el ácido glucónico, presentaron una menor adsorción en la EBD. De acuerdo con la forma de las isotermas, se sugiere que la adsorción de ambos AO produce la saturación de los sitios de adsorción, condición que podría disminuir la liberación de P desde la EBD.

En términos generales la aplicación de los ácidos orgánicos estudiados aumentó la disponibilidad de Pi en la EBD; el ácido cítrico fue más efectivo para liberar Pi comparado con el ácido málico, oxálico y glucónico. La información obtenida tiene gran utilidad práctica, debido a que permite conocer la efectividad de los distintos ácidos estudiados y permite estimar la liberación de Pi potencial, al utilizar distinto AO y distintas dosis de AO.

4.5. Disponibilidad de fósforo en un suelo de origen volcánico, enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

4.5.1. Efecto de la EBD, sobre el pH del suelo.

La variación del pH del suelo, con y sin aplicación de EBD, se muestra en la Figura 4.15. Se observó que el pH, tanto en el suelo control como en el suelo enmendado, disminuyó cerca de 1 unidad en todos los tratamientos durante el tiempo estudiado. Por otra parte, la aplicación de la EBD, provocó un incremento del pH comparado con el suelo control. Los incrementos de pH con respecto al suelo control, registrados en el día 64, fueron de 0,23; 0,34; 0,48 y 0,58 unidades para las dosis de 3, 6, 9 y 18 g EBD kg^{-1} suelo, respectivamente, y fueron atribuidos a la alcalinidad de la excreta.

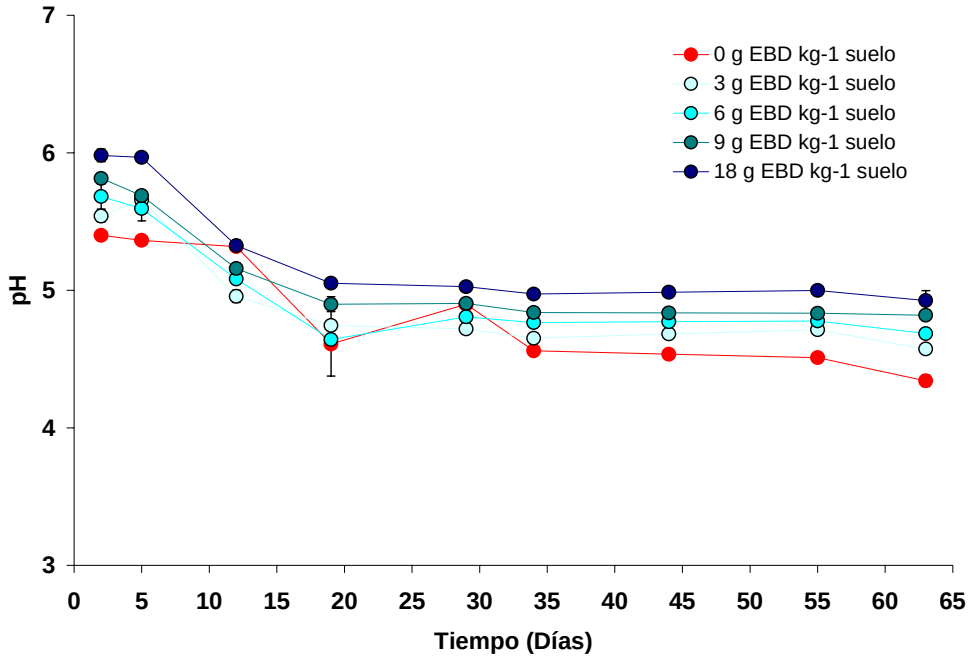


Figura 4.15. Variación del pH de un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

La disminución del pH del suelo control, se debió al proceso natural de acidificación de los Andisoles del Sur de Chile, originado por la mineralización de la materia orgánica, con la consecuente liberación de H_3O^+, Al^{3+} y Mn^{2+}, por la disminución del pH (pH $\leq$ 5,5) y por la actividad biológica (Borie y Zunino, 1983; Borie et al., 1989; Mora y Canales, 1995a; Mora y Canales, 1995b). Por otra parte, la estabilización del pH después del día 30, en el suelo control y en el suelo enmendado, se podría relacionar con el efecto amortiguador de la materia orgánica del suelo y de la EBD, lo cual se debe a la adsorción de moléculas orgánicas e inorgánicas por intercambio de ligandos con liberación de grupos OH^- y el consumo de H_3O^+ por grupos funcionales de la materia orgánica (Mokolobate y Haynes, 2002).

4.5.2. Efecto de la EBD sobre el P disponible extraído en bicarbonato de sodio.

La variación del Pt disponible, extraído en bicarbonato de sodio, tanto en el suelo control como en el suelo enmendado con EBD, se muestra en la Figura 4.16; se observó que la concentración de este parámetro decreció significativamente ($P \leq 0,05$) en el tiempo, con todas las dosis aplicadas. Por otra parte, la concentración de Pt disponible incrementó significativamente ($P \leq 0,05$) con respecto al suelo control, con cualquiera de las dosis de EBD aplicadas. Los incrementos registrados en el día 64, con respecto al suelo control fueron de 14, 21, 39 y 83 % con las dosis de 3, 6, 9 y 18 g EBD kg^{-1} suelo, respectivamente.

Las variaciones de Pi disponible, extraído en bicarbonato de sodio, en el suelo control y en el suelo enmendado con EBD, se muestran en la Figura 4.17. Por una parte, se observó que la concentración de Pi disponible incrementó, con respecto al suelo control a medida que incrementó la dosis de excreta. Después de 64 días de incubación, el Pi disponible incrementó significativamente ($P \leq 0,05$) en 1,3; 2,7; 3,9 y 5,8 veces, con respecto al suelo control cuando se aplicaron las dosis de 3; 6, 9 y 18 g EBD kg^{-1} suelo, respectivamente. Por otra parte, se observó que la concentración de Pi disminuyó significativamente ($P \leq 0,05$) en el tiempo, tanto en el suelo control como en el suelo enmendado con EBD. La disminución promedio para el suelo control y para la dosis de 3 g EBD kg^{-1} suelo fue de

58%, en cambio, para las dosis mayores la disminución fue cercana al 43%, lo que indicó que la incorporación de EBD disminuye la fijación de P. Este fenómeno puede ser originado por los siguientes factores:1) el incremento del pH del suelo; 2) por el contenido de Pi de la EBD y 3) por la desorción de fosfato generada por la materia orgánica de la EBD. En este contexto, se ha descrito que los residuos orgánicos contienen compuestos tipo ácidos húmicos y fúlvicos, que pueden ser adsorbidos sobre la superficie del suelo, lo cual produce por una parte, el bloqueo de los sitios para la adsorción de grupos fosfato, así como también produce la inhibición de la formación de complejos entre P y Ca, Al o Fe (Haynes y Mokolobate, 2001; Mkhabela y Warman, 2005).

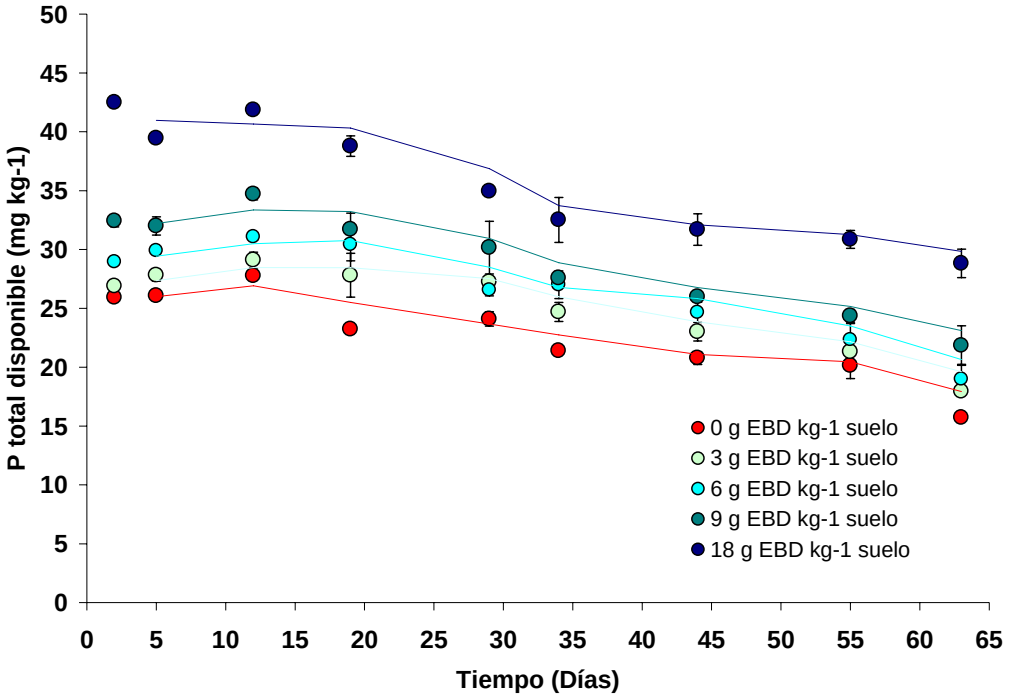


Figura 4.16. Dinámica de Pt disponible (extraído en bicarbonato de sodio) en un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

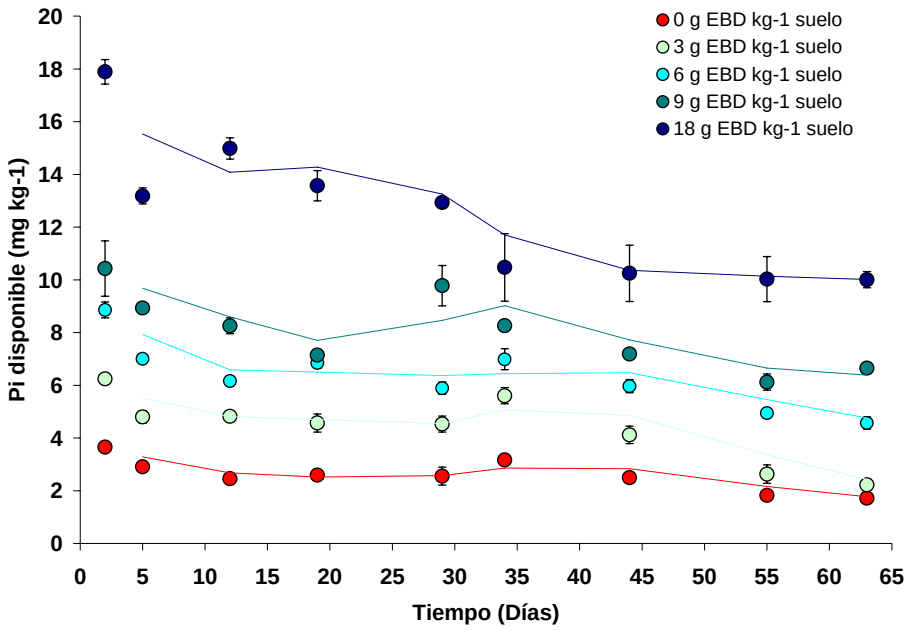


Figura 4.17. Dinámica de Pi disponible (extraído en bicarbonato de sodio) en un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

En forma paralela a los procesos antes mencionados, es fundamental considerar que en los suelos enmendados con residuos de origen animal, ya sean purines, excretas o compost, se genera un enriquecimiento de fosfatos de calcio con distinto grado de solubilidad (Sharpley, et al., 2004; Penn and Bryant, 2008). La solubilidad de los compuestos P-Ca es relativamente baja a pH neutro, pero incrementa a medida que disminuye el pH, liberando iones fosfato. Por otra parte, se debe recordar que una disminución de pH incrementa la concentración de iones Al y Fe en solución, los cuales pueden interactuar con el P disponible, liberado desde los compuestos P-Ca, a través de una readsorción o bien de una precipitación, disminuyendo así su disponibilidad. Penn and Bryant, (2008), indicaron que la disminución del P disponible debido a los procesos de acidificación en suelos enmendados con residuos ricos en compuestos Ca-P, depende de la cantidad de compuestos Ca-P y de las propiedades del suelo en cuanto a la reactividad de los iones Al y Fe. Mirado desde ese punto de vista, en este ensayo se observó que la concentración de Pi en el suelo enmendado, con las dosis de 3 a 9 g EBD kg^{-1} suelo, no mostró un incrementó durante el periodo de acidificación (primeros 30 días), este comportamiento puede indicar que pese a la disolución de los compuestos Ca-P el P liberado pudo haber sido reabsorbido y/o

precipitado por la presencia de los iones Fe y Al, que se presentan en concentraciones importantes en Andisoles a pH inferiores a 5,5 (Mora y Barrow, 1996). Lo anterior concuerda con los estudios de Baeza (2002) realizados en un Andisol enmendado con excreta de bovino, donde no fue posible cuantificar el aporte de P disponible a expensas de la solubilización de los compuestos P-Ca, originados durante el periodo de acidificación del suelo, debido a la fijación del P con el Al y el Fe intercambiables del suelo.

El Po disponible, extraído en bicarbonato de sodio, disminuyó significativamente ($P \leq 0,05$) entre las 48h y los 64 días de incubación tanto en el suelo control como en el suelo enmendado con la EBD (Figura 4.18). Por otra parte, el Po incrementó con respecto al suelo control; aunque sólo se registró un incremento significativo ($P \leq 0,05$) con la dosis de 18 g EBD kg^{-1}. Con dosis menores o iguales a 9 g EBD kg^{-1}, las concentraciones de Po disponible no mostraron una directa relación con la dosis de EBD aplicada.

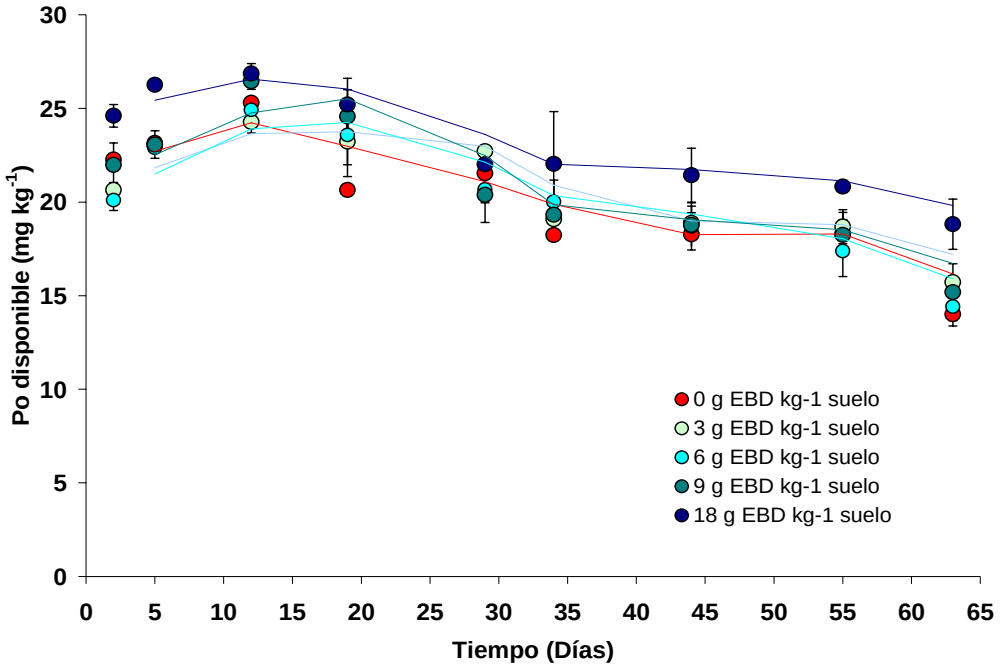
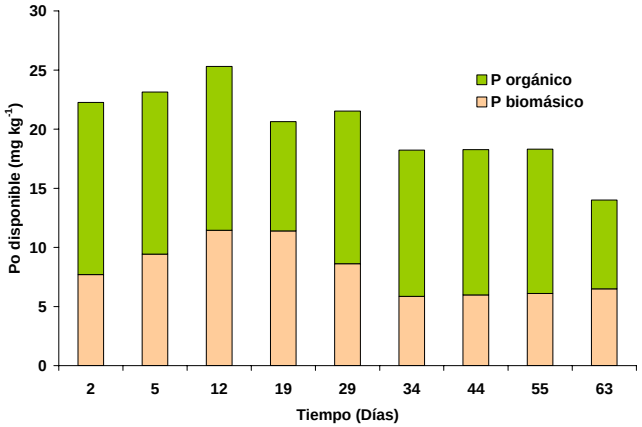
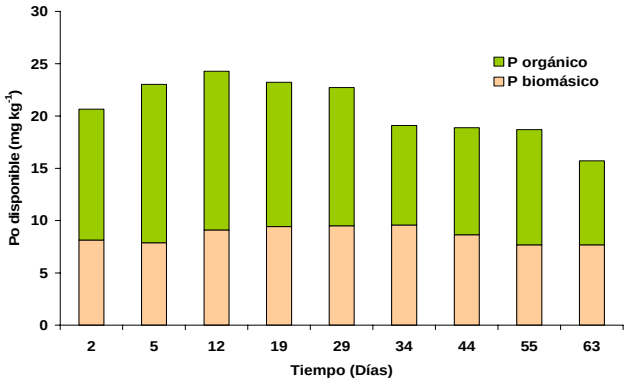


Figura 4.18. Dinámica de Po disponible (extraído con bicarbonato de sodio) en un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

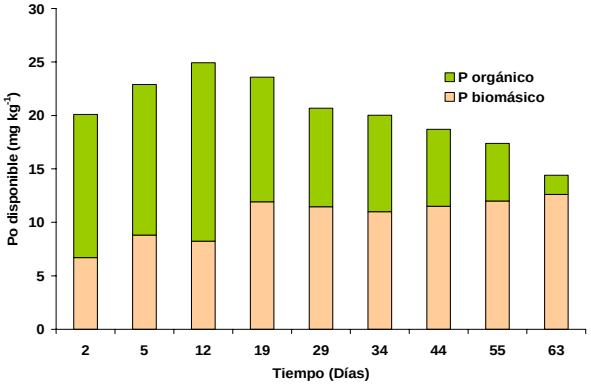
Con la aplicación de 18 g EBD kg^{-1} suelo, se incrementó la concentración de Po disponible, con respecto al suelo control, en 2 mg kg^{-1} a las 48h de incubación y en 4 mg kg^{-1} una vez finalizado el periodo de incubación. Este fenómeno pudo estar asociado a factores como por ejemplo: la baja contribución de Po disponible por parte de la EBD, a la fijación de Po y/o mineralización del Po disponible. De acuerdo con los datos del fraccionamiento de P de la excreta de bovino (Tabla 4.2), sólo un 40% del P total de la excreta se encuentra como P disponible, en las fracciones P-H_2O y P-$NaHCO_3$, de los cuales el 37% corresponde a Pi y 3% corresponde a Po, lo que indica que la EBD aporta principalmente con Pi disponible. Estudios de Baeza (2002) realizados en un Andisol del sur de Chile, mostraron que la aplicación de excreta de bovino incrementa la concentración de P en la fracción de HCl del suelo hasta el día 60 de incubación; así como también incrementa la concentración de P-residual después de 150 días de incubación. Leinweber et al., (1997) determinaron que la aplicación de purines de ave o de cerdo en suelos, si bien contribuye a incrementar el P disponible también genera un aumento de fracciones mas recalcitrantes que se extraen con ácido.



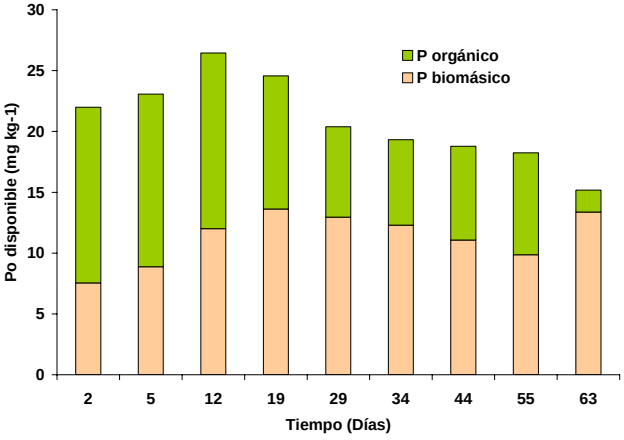
0 mg EBD g^{-1} suelo (Control)



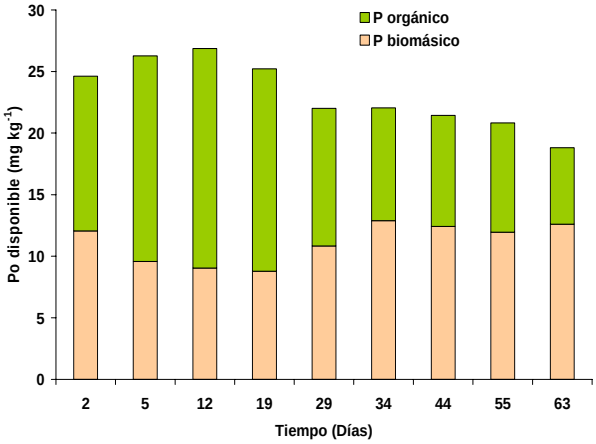
3 mg EBD g^{-1} suelo



6 mg EBD g^{-1} suelo



9 mg EBD g^{-1} suelo



18 mg EBD g^{-1} suelo

Figura 4.19. Contenido de P biomásico en relación al P orgánico disponible (extraído con bicarbonato de sodio), en un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

El contenido de P biomásico (Figura 4.19) en los suelos enmendados con EBD fue irregular durante los primeros 30 días de incubación; sin embargo, después del día 30 de observó un incremento con las dosis mas altas de EBD aplicadas. El incremento del P biomásico podría haber afectado también, la disminución de Pi disponible. Un fenómeno similar fue observado por Baeza (2002) en un Andisol enmendado con excreta de bovino, donde se detectaron incrementos de la biomasa microbiana después de 60 días desde la aplicación de la excreta, lo cual fue asociado a la existencia de poblaciones microbianas que podrían degradar compuestos menos disponibles de N.

Aunque los métodos convencionales para la determinación del P disponible, están enfocados a la determinación del Pi, se ha comprobado que el Po extraído en bicarbonato de sodio, puede representar una importante fracción del P potencialmente disponible en suelos (Turner y Haygarth, 2003). Esta situación se vio reflejada en los altos contenidos de Po disponible que se registraron en el suelo Piedras Negras (máximo de 25 mg kg^{-1}) en comparación con el Pi disponible (máximo de 4 mg kg^{-1}). Borie y Rubio (2003) en su revisión del Po en los suelos volcánicos del Sur de Chile, indicaron que el Po puede constituir más del 50% del P total del suelo, similares proporciones fueron encontradas en extractos de bicarbonato de sodio. Redel et al., (2007) informaron contenidos de Po entre 34 y 53 mg kg^{-1} en extractos de bicarbonato de sodio de un Ultisol del sur de Chile, bajo diferentes practicas de manejo y rotación de cultivos, valores que correspondieron a 45 y 57% del Pt en el extracto de bicarbonato de sodio.

En otros tipos de suelo (Entisol, Inceptisol y Alfisol), también se ha reportado un alto porcentaje de Po en extractos de bicarbonato de sodio; por ejemplo, Turner y Haygarth, (2003) encontraron que entre un 26 y 82% del Pt en el extracto de bicarbonato, corresponde a Po. Pese a la elevada proporción de Po en los extractos de bicarbonato, existe una limitada información respecto a su composición. En este contexto, los estudios de Zhang et al., (1999) realizados en un Alfisol, indicaron que las especies monoester fosfato y en menor proporción de especies diéster fosfato están presentes en extractos de bicarbonato de sodio. Estudios realizados por Baeza (2002), en un Andisol enmendado con excreta de

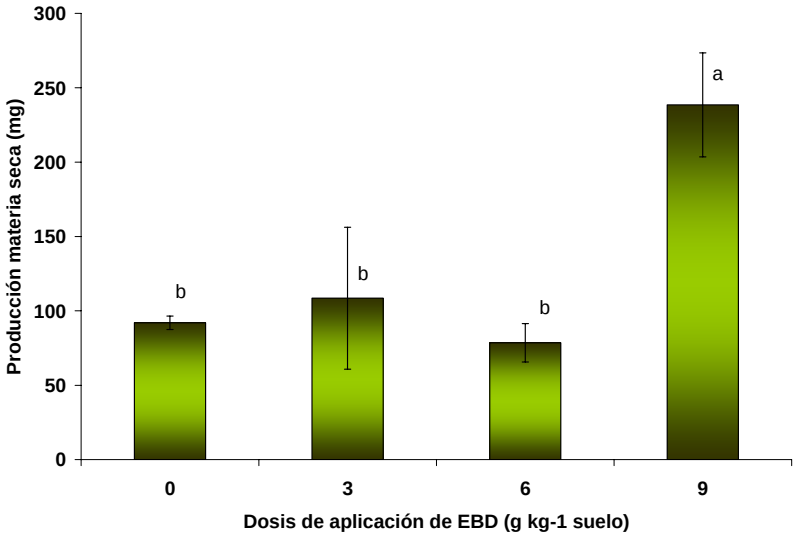
bovino, dan cuenta de la presencia de Po en lixiviados de suelo encontrando mayoritariamente compuestos diéster fosfato.

Los resultados obtenidos indicaron que la aplicación de EBD en el suelo Piedras Negras, origina la acumulación de P total en el suelo. Parte del P disponible entregado por la EBD, pudo ser adsorbido en las arcillas y óxidos del suelo (principalmente alofán y ferrihidrita) o bien, pudo formar complejos de Al - MO - P y/o Fe - MO - P, como ha sido descrito previamente por Borie y Zunino (1983). La acumulación de P en el suelo favorece su entrega lenta y sostenida en el tiempo, por lo cual se asegura un stock del nutriente para los cultivos y las praderas. Sin embargo, para mantener la fertilidad de los Andisoles y suministrar los requerimientos inmediatos de P para las plantas, es necesario optimizar la disponibilidad del P en la EBD y en el suelo, de esta manera se dará un uso eficiente al P de la EBD y se conseguirá disminuir la tasa de aplicación de fertilizantes fosfatados.

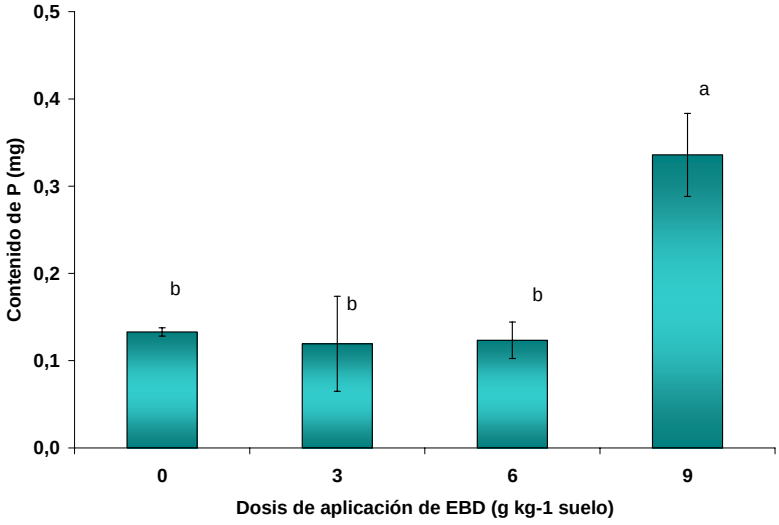
4.6. Estudio del fósforo y de los ácidos orgánicos en la rizósfera de *Lolium perenne,* utilizando un suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

4.6.1. Producción de materia seca y captación de fósforo.

La producción de materia seca y el contenido de P en plantas de *Lolium perenne*, proveniente de los rizotrones con distintas dosis de EBD, se muestran en la Figura 4.20a y 4.20b, respectivamente. Se observó que ambos parámetros incrementaron a medida que se aumentó la dosis de EBD; sin embargo, sólo se registraron diferencias significativas con la dosis de 9 g EBD kg^{-1} suelo ($P \leq 0{,}05$). En el Anexo 2, se muestran fotografías de las plantas de *Lolium perenne*.



(a)



(b)

Figura 4.20. Materia seca (a) y contenido de P (b) en plantas de *Lolium perenne* (cuantificados en un total de 6 plantas por rizotrón), utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta bovino degradada (EBD). Letras distintas denotan diferencias significativas ($P \leq 0{,}05$).

4.6.2. Variación del pH y de la concentración de aniones en la solución rizosférica.

La variación del pH de la solución rizosférica de *Lolium perenne,* se muestra en la Figura 4.21. Durante los primeros 10 días se observó un incremento del pH en todos los tratamientos, el incremento del pH fue mayor con la dosis más alta lo cual fue atribuido a la alcalinidad de la enmienda aplicada. A partir del día 10 se registró un decrecimiento promedio de 1 unidad de pH para todos los tratamientos alcanzando valores de pH cercano a 4,5, lo cual tendría relación con la liberación de protones debido a la nitrificación del NH_4^+ adicionado como fertilizante y del amonio contenido en el suelo Piedras Negras (Cartes et al., 2008).

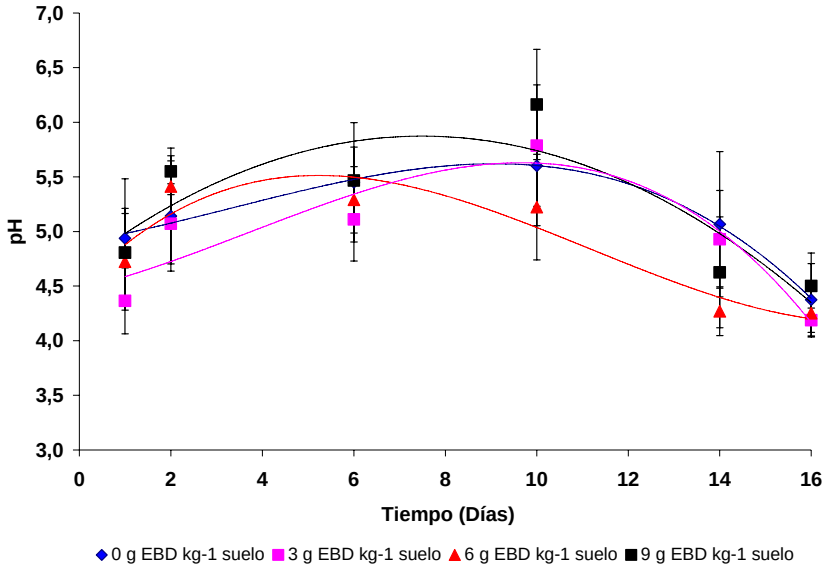


Figura 4.21. Variación del pH en la solución rizosférica de *Lolium perenne,* utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta bovino degradada (EBD).

La variación de fosfato en la solución rizosférica se muestra en la Figura 4.22. Las mayores concentraciones de fosfato estuvieron entre 5,5 y 4 µM y se detectaron durante el segundo día de muestreo en la soluciones rizosféricas del suelo control y de los suelos enmendados con las dosis mas bajas de EBD. La menor concentración de fosfato se registró en la solución rizosférica del suelo enmendado con 9 g EBD kg^{-1} suelo, lo cual fue atribuido a la

mayor absorción de P de las plantas de *Lolium perenne* (Figura 4.20b) que también presentaron mayor contenido de materia seca, lo cual provocó una disminución de fosfato en la solución de la rizósfera. En relación a estos resultados, la literatura informa que la concentración de fosfato en la proximidad de las raíces es irregular y temporalmente variable. Estas variaciones están relacionadas con la captación de P por la planta, la exudación de ácidos orgánicos, la variabilidad espacial de P debido al transporte por difusión y a la presencia de enzimas fosfatasas (Dessureault-Rompré et al., 2007).

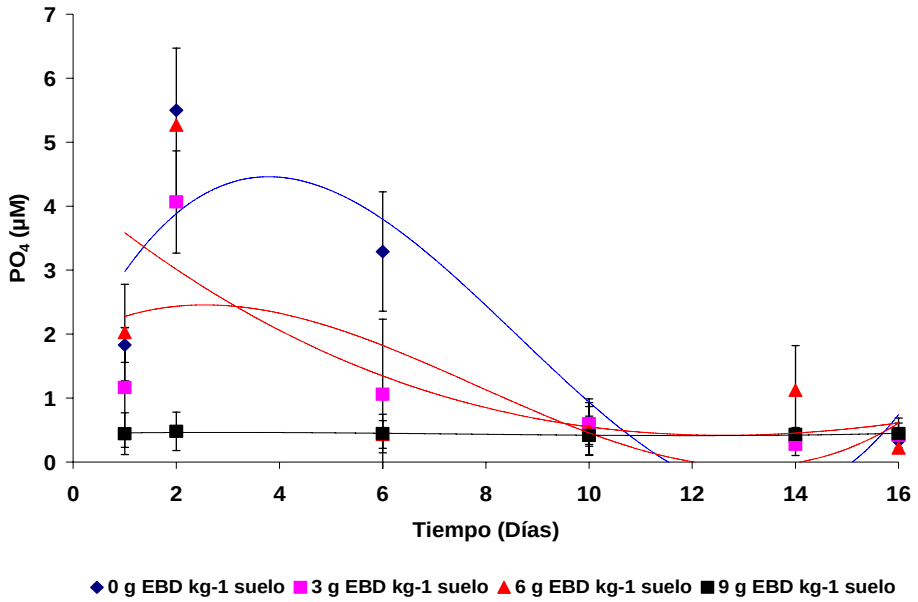


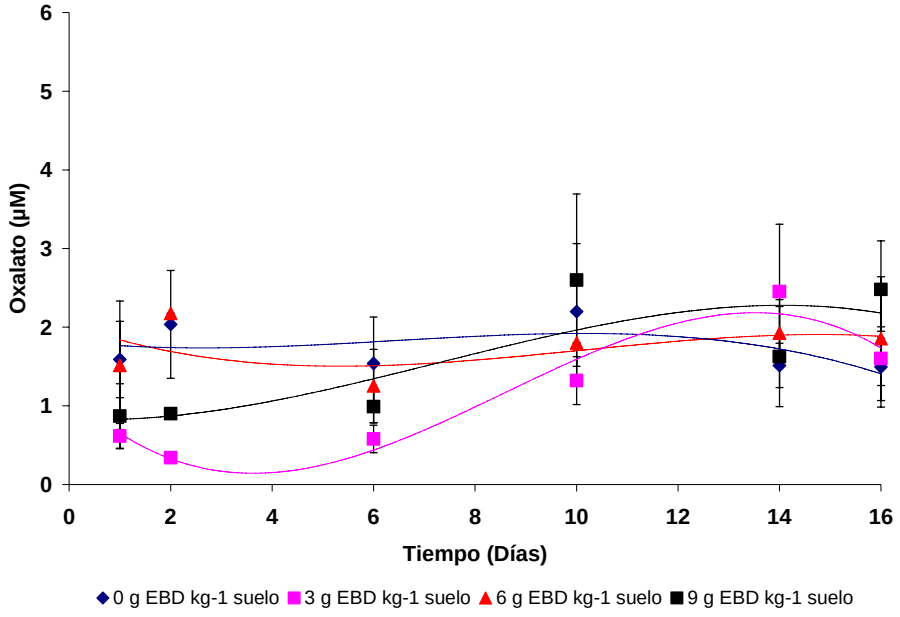
Figura 4.22. Dinámica de fosfato en la solución rizosférica de *Lolium perenne*, utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD).

En la solución rizosférica de *Lolium perenne*, se determinaron las concentraciones de citrato, oxalato, formiato y acetato. En las Figuras 4.23 y 4.24 se muestra la dinámica de los aniones orgánicos, donde se determinó una baja concentración de formiato y de oxalato (Figura 4.23) con concentraciones máximas de 4 µM y 2 µM, respectivamente; la concentración de ambos aniones, fue variable en el tiempo y fue independiente de la dosis de EBD aplicada. En cambio, se observaron altas concentraciones de citrato y de acetato (Figura 4.24), con valores máximos de 25 y 28 µM, respectivamente, las que fueron cuantificadas en la solución rizosférica del suelo control. La concentración de ambos aniones decreció en el tiempo, y disminuyó a medida que se incrementó la dosis de EBD;

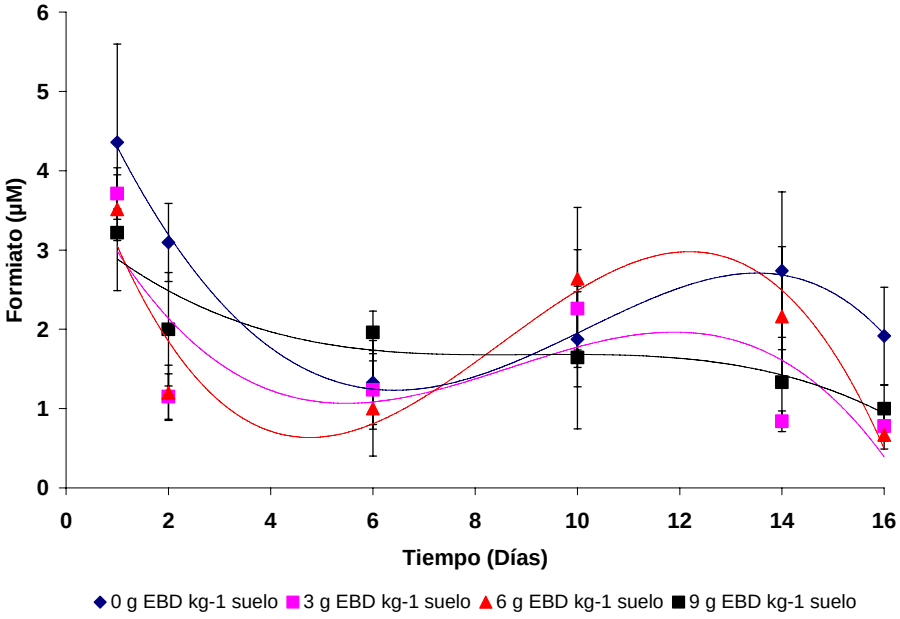
después del día 10, la concentración de citrato se mantuvo bajo el límite de detección del equipo. Se ha reportado que la máxima concentración de citrato en exudados de plantas que crecen bajo deficiencia de P ocurre al tercer día de incubación y luego decrece rápidamente (Shen et al., 2002). Estudios de Dessureault-Rompré et al., (2007) demostraron que la exudación de citrato, por lupino, alcanza un máximo de 2 mM entre los días 3 a 4, y posteriormente decrece. El rápido decrecimiento del citrato en la rizósfera, ha sido relacionado con el consumo microbiano, con la difusión espacial en la solución del suelo y principalmente, con la adsorción sobre los constituyentes del suelo (Jones, 1998).

En la solución rizosférica del suelo control, la concentración de fosfato mostró correlación con la concentración de citrato ($r = 0{,}711$; $P \leq 0{,}05$), y de acetato ($r = 0{,}703$; $P \leq 0{,}05$), lo cual indicó que el P aumentó a medida que incrementó la concentración de ambos AO. Si bien éstos se encontraron en cantidades similares y mostraron correlación con fosfato, es posible que el citrato contribuya en mayor medida a mantener el P en la solución rizosférica. Shen et al., (2002) demostraron que el citrato es el principal ácido orgánico presente en los exudados de raíces de poroto que crecen bajo deficiencia de P, y además informaron que entre un 55 a 73 % de la capacidad total de los ácidos exudados para movilizar P desde P-Al y P-Fe es atribuida al citrato.

En la solución rizosférica del suelo control y del suelo enmendado con 3 y 6 g EBD kg^{-1} suelo, se observó un mayor contenido de fosfato (Figura 4.22) y de citrato (Figura 4.24), este comportamiento fue atribuido a que *Lolium perenne* aumenta la exudación de citrato exudado para incrementar la concentración de P en la solución rizosférica. En cambio en la solución rizosférica del suelo enmendado con 9 g EBD P kg^{-1} suelo, se observaron bajas concentraciones de citrato y de fosfato. La baja concentración de fosfato, se debió a la captación por parte de *Lolium perenne*, la baja concentración de citrato se atribuyó a que en respuesta de altos contenidos de P disponible la planta disminuye la exudación de citrato. Estos resultados sugieren que la mayor captación de P por *Lolium perenne*, no estimula la exudación de citrato; en cambio, la carencia de P estimula la exudación de citrato, como una respuesta fisiológica de la planta a los bajos niveles de P disponible.

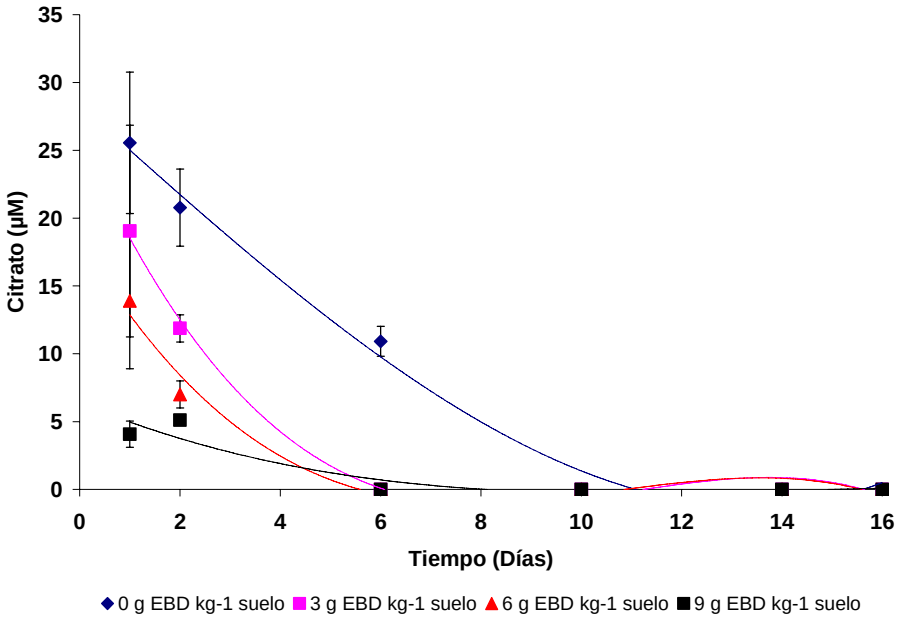


(a)

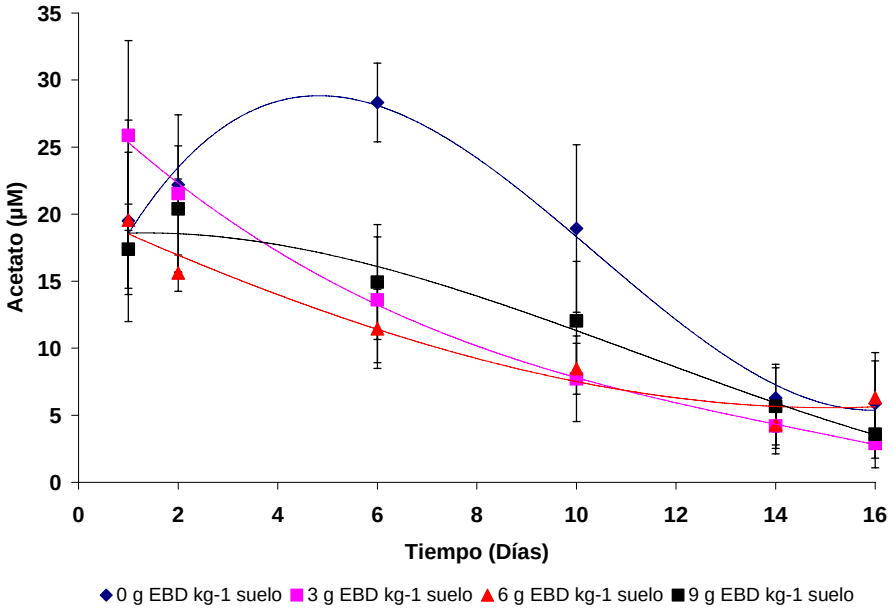


(b)

Figura 4.23. Dinámica de aniones orgánicos en la solución rizosférica de *Lolium perenne*, utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD), oxalato (a) y formiato (b).



(a)



(b)

Figura 4.24. Dinámica de aniones orgánicos en la solución rizosférica de *Lolium perenne*, utilizando suelo de origen volcánico enmendado con excreta de bovino degradada (EBD), citrato (a) y acetato (b)

Nuruzzaman et al., (2006) cuantificaron elevadas concentraciones de ácido cítrico en la rizósfera de lupino blanco sin la aplicación de fertilización fosfatada, al mismo tiempo que detectaron alta actividad fosfatasa ácida. Se ha comprobado que la exudación de ácido cítrico favorece la captación del P por las plantas, debido a la liberación de P desde fracciones lábiles (P extraido en $NaHCO_3$) y menos lábiles en el suelo (P-NaOH) (Nuruzzaman et al., 2006; Shen et al., 2003). Se ha comprobado que el ácido cítrico es el principal ácido orgánico exudado por las raíces de distintas plantas (lupino blanco, tomate, trigo) que crecen bajo deficiencia de P (Gahoonia et al., 2000; Shen et al., 2002; Chen et al., 2002; Nuruzzaman et al., 2006; Wang et al., 2008; Shen et al., 2003). Se ha documentado que la deficiencia de P genera cambios metabólicos en la raíz, lo cuales se ven reflejados en el aumento de la exudación de ácidos orgánicos y de protones (Neumann y Römheld, 1999).

Los resultados obtenidos en este estudio, muestran que la aplicación de dosis de 9 g EBD kg^{-1} suelo, contribuye a incrementar el P disponible en la rizósfera de *Lolium perenne*, lo cual se vio relejado en la mayor absorción de P, en la mayor producción de biomasa y en el bajo contenido de citrato en la solución rizosférica. En cambio con dosis menores de 9 g EBD kg^{-1} suelo, se observó una baja producción de materia seca, similar al control, una menor absorción de P por las plantas de *Lolium perenne* y consecuentemente una mayor concentración de ácidos orgánicos y de P en la solución rizósferica.

5. CONCLUSIONES

- La actividad biológica que se genera durante la etapa inicial (hasta los 30 días) de la degradación aerobia de la excreta de bovino influye sobre la dinámica de P, debido a que modifica las condiciones fisicoquímicas del medio, y favorece los procesos de inmovilización – mineralización de P.

- Los resultados del fraccionamiento secuencial de P, señalaron que se producen modificaciones en las fracciones de P con el tiempo. El P inorgánico incrementó en la fracción P-$NaHCO_3$ y se mantuvo constante en la fracción P-H_2O. El P orgánico de las fracciones de menor disponibilidad (P-NaOH y P-HCl) diminuyó, lo que originó un desplazamiento del P hacía la fracción recalcitrante, incrementando el P-residual.

- Durante la degradación aerobia de la excreta de bovino fue posible aislar e identificar bacterias con capacidad para utilizar fitato, pertenecientes los géneros *Enterobacter, Rahnella, Escherichia, Shigella, Streptomyces, Bacillus* y *Ochrobactrum*. Los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75 fueron predominantes al final del proceso de degradación y presentaron una capacidad estable para solubilizar fitato. Además ambas cepas bacterianas, presentaron capacidad para solubilizar fosfato de calcio y expresaron actividad fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y fosfohidrolasa.

- Se comprobó que es posible incrementar la disponibilidad de P de la excreta de bovino degradada, por medio de la inoculación de bacterias pertenecientes a géneros *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75 aisladas durante la degradación aerobia de la excreta de bovino, y por medio de la aplicación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular.

- El ácido cítrico presentó mayor capacidad para liberar P inorgánico desde la excreta de bovino degradada, comparado con los ácidos málico, oxálico y glucónico. La aplicación de 2,8 mmol ácido cítrico g^{-1} EBD, incrementa en un 40% la liberación de P inorgánico,

mientras que dosis equivalentes de los otros ácidos orgánicos estudiados incrementan entre un 15 y un 20% la liberación de Pi desde la excreta de bovino degradada.

- La aplicación de excreta de bovino degradada en un suelo de origen volcánico, incrementa la concentración de P disponible, lo cual modifica la dinámica de P y de los ácidos orgánicos presentes en la rizósfera de *Lolium perenne*. Este estudio mostró claramente que la aplicación de excreta de bovino degradada aporta con P disponible, lo que provoca una mayor absorción de P por la planta y una mayor producción de materia seca, mientras que en la solución rizosférica se produce una disminución de la concentración de fosfato, de citrato y de acetato.

- Las investigaciones realizadas permitieron identificar herramientas biotecnológicas para incrementar la disponibilidad de P en residuos orgánicos. Para dar continuidad a esta línea de investigación, es necesario desarrollar estudios orientados a las formas de aplicación que permitan incrementar la eficiencia de las bacterias utilizadoras de fitato y de los ácidos orgánicos cuando se aplican en suelos o en residuos orgánicos.

6. PROYECCIONES

- Los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75, obtenidos durante la degradación aerobia de la excreta de bovino, tienen capacidad para utilizar fitato, solubilizar fosfato de calcio y presentan actividad fosfata. Se comprobó que la inoculación de estos aislados, en la excreta de bovino degradada, incrementa la disponibilidad de P. Por lo tanto, se plantea que el estudio de las condiciones de cultivo y de las distintas técnicas de aplicación serían necesarios para proyectar su uso como biofertilizantes cuando son aplicados en sistemas naturales.

- Se hace necesario estudiar los ácidos orgánicos liberados, por los aislados bacterianos *Enterobacter* sp. B-95 y *Rahnella* sp. D-75, en presencia de compuestos de P con distinta solubilidad, esta información será útil para ampliar el espectro de aplicación de estas bacterias.

- Los altos porcentajes de Po disponible, en el suelo de origen volcánico serie Piedras Negras, indican que es necesario realizar estudios para optimizar la mineralización de estos compuestos, lo cual permitirá incrementar el Pi disponible y disminuir así, la tasa de fertilización fosforada.

- Las investigaciones a nivel rizosférico permiten dilucidar el efecto de la aplicación de residuos orgánicos sobre las plantas, mediante el estudio de la relación existente entre la producción vegetal, la captación de P y la exudación de AO, en presencia de distintas enmiendas orgánicas. Por lo tanto, se propone que los estudios de interacción suelo - residuo orgánico - planta podrían ayudar a comprender el reciclaje de nutrientes desde los residuos orgánicos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, P. R. and Sikora L. J. 2003. Changes in soil phosphorus availability with poultry compost age. Commun. Soil Sci. Plan. 34(1&2): 81-95.

Ajiboye, B., Akinremi, O. O. and Racz, G. J. 2004. Laboratory characterization of phosphorus in fresh and over-dried organic amendment. J. Environ. Qual. 33: 1062-1069.

Alef, Kassem and Nannipieri, Paolo. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Editorial Academic Press. Capitulo 8.

Andlid, T. A., Veide, J. and Sanberg, A. 2004. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol. 97: 157-169.

AOAC, 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Horwith, W. (Ed.). Washington, D.C., USA.

Atlas, R. M. and Bartha, R. 1997. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Benjamin-Cummings, CA, USA.

Baeza, G. 2002. Un modelo para el reciclaje de nitrógeno, fósforo y azufre en el sistema suelo-planta-animal en suelos ácidos. Tesis Doctorado. Universidad de Santiago de Chile.

Barnett, G. M. 1994. Phosphorus forms in animal manure. Bioresource Technol. 49: 139-147.

Barrow, J. 1975. Chemical form of inorganic phosphate in sheep faeces. Aust. J. Soil. Res. 13: 63-67.

Bernal, M. P., Alburquerque., J.A. and Moral, R. 2008. Composting of animal manure and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. Bioresource Technol. doi:10.1016/j.biortech.2008.11.027.

Bhatti, J. S., Comerford, N. B. and Johnston, C. T. 1998. Influence of soil organic matter removal and pH on oxalate sorption onto a spodic horizon. Soil Sci. Soc. Am. J. 62: 152-158.

Bol, R., Amelung, W. and Haumaier, L. 2006. Phosphorus-31–nuclear magnetic–resonance spectroscopy organic dung phosphorus in a temperate grassland soil. J. Plant Nutr. Soil Sc. 169: 69–75.

Bolan, N. S., Naidu, R., Mahimairaja, S. and Baskaran, S. 1994. Influence of low-molecular-weight organic acid on the solubilization of phosphates. Biol. Fert. Soils. 18: 311-319.

Borie, F. and Zunino. H. 1983. Organic matter-phosphorus association as a sink in P-fixation processes in allophanic soil of Chile. Soil Biol. Biochem. 15: 599-603.

Borie, F., Zunino, H. and Martinez, L. 1989. Macromolecule-P associations and inositol phosphates in some Chilean volcanic soils of temperate regions. Commun. Soil Sci. Plan. 20 (17&18) 1881-1894.

Borie F., Rubio R. and Schalchli., C. 1998. Micorrizas arbusculares y actividad fosfatásica de diez cultivares de trigo. Agric. Téc. 58:47-55.

Borie, F. and Rubio, R. 2003. Total and organic phosphorus in chilean volcanic soils. Gayana Bot. 60(1): 69-78.

Briceño, M., Escudey, M., Galindo, G., Borchardt, D. and Chang. A. 2004. Characterization of chemical phosphorus forms in volcanic soils using ^{31}P-NMR spectroscopy. Commun. Soil Sci. Plan. 35: (9&10), 1323-1337.

Bristow, A. 2007. Determination of total phosphorus in water. In standard test Method. IGER analytical methods. Devon. UK.

Brookes, P.C., Powlson, D.S. and Jenkinson, D.S. 1984. Phosphorus in the soil microbial biomass. Soil Biol. Biochem. 16, 169–175.

Cade-Menun, B. 2005. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Talanta. 66: 359–371

Cartes, P., Jara, A., Demanet, R. and Mora, M. L. 2009. Urease activity and nitrogen mineralization kinetics as affected by temperature and urea input rate in southern Chilean Andisols. J.Soil Sc. Plant. Nutr. In Press.

Celi, L., Presta, M., Ajmore-Marsan, F. and Barberis, E. 2001. Effects of pH and electrolytes on inositol hexaphosphate interaction with goethite. Soil. Sci. Soc. Am. J. 65: 753-760.

Chen, R.C., Condron, L.M., Davis M.R. and Sherlock, R. R. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium prerenne L.*) and radiata pine (*Pinus radiate* D.Don.). Soil Biol. Biochem. 34: 487-499.

Chen, Y. P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.-A. and Young, C. C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl. Soil. Ecol. 31: 33-41.

Chen, Z., Ma, S. and Liu, L. 2008. Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. Bioresource Technol. doi:10.1016/j.biortech.2007.03.064.

Choi, M.H. and Park, Y.H., 1998. The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. Lett. Appl. Microbiol. 26: 175–178.

Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H. and Sa, T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biol. Biochem. 37:1970-1974.

Cosgrove, D. J. 1980. Inositol phosphate. Studies in organic chemistry. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Dao, T. H. 2003. Polyvalent cation effects on *myo*-inositol hexakis dihydrogenphosphate enzymatic dephosphorylation in dairy wastewater. J. Environ. Qual. 32: 694-701.

De Brouwere, K., Thijs, A., Hens, M. and Merckx, R. 2003. Forms and bioavailability of soil phosphorus in temperate forest in southern Chile and Flanders. Gayana Bot. 60: 17-23.

Delvasto, P., Ballester, A., Muñoz, J.A., Gonzalez, F., Blázquez, M.L., Igual, J.M., Valverde, A. and García-Balboa, C. 2008. Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium *Burkholderia caribensis* FeGL03. Minerals Engineering. doi:10.1016/j.mineng.2008.03.001.

Deng, S. P. and Tabatabai, M. A. 1997. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soil: III. Phosphatases and arylsulfatase. Biol. Fert. Soils. 24, 141-146.

Dessureault-Rompré, J., Nowack, B., Schulin, R. and Luster, L. 2007. Spatial and temporal variation in organic acid anion exudation and nutrient anion uptake in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. Plant Soil. 301:123–134.

Dick, W. A., Cheng, L. and Wang, P. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. Soil Biol. Biochem. 32: 1915-1919.

Dou, Z., Toth, J. D., Galligan, D. T., Ramberg, C.F. and Ferguson, J.D. 2000. Laboratory procedures for characterizing manure phosphorus. J. Environ. Qual. 29:508–514.

Dou, Z., Knowlton, K. F., Kohn, R. A., Wu, Z., Satter, L. D., Zhang, G., Toth, J.D. and Ferguson, J. D. 2002. Phosphorus characteristics of dairy feces affected by diets. J. Environ. Qual. 31, 2058–2065.

Ebeling, A. M., Bundy, L. G., Powell, J. M. and Andraski, T. W. 2002. Dairy diet phosphorus effect on phosphorus losses in runoff from land-applied manure. Soil. Sci. Soc. Am. J. 66: 284-291.

Escudey, M., Galindo, G., Förster, J. E., Briceño, M., Diaz, P. and Chang, A. 2001. Chemical forms of phosphorus of volcanic ash-derived soil in Chile. Commun. Soil. Sci. Plan. 32 (5&6): 601-616.

Frossard, E., Skrabal, P., Sinaj, S., Bangerter, F. and Traore, O. 2002. Forms and exchangeability of inorganic phosphate in composted solid organic waste. Nutr. Cycl. Agroecosys. 62: 103-113.

Fuentes, B., Bolan, N., Naidu, R., and Mora, M.L., 2006. Phosphorus in organic-waste soil system. J.Soil Sc. Plant. Nutr. 6, 64–83.

Gahoonia, T., Asmar, F., Giese, H., Gissel-Nielsen, G. and Nielsen, N. 2000. Root-released organic acids and phosphorus uptake of two barley cultivars in laboratory and field experiments. Eur. J. Agron. 12: 281-289

García-Gill, J.C., Ceppi, S. B., Velasco, M. I., Polo, A. and Senesi, N. 2004. Long- term effect of amendment whit municipal solid waste compost on the elemental and acidic functional group composition and pH-buffer capacity of soil humic acids. Geoderma. 121: 135-142.

Geelhoed, J. S., Van Riemsdijk, W. H. and Findenegg, G. R. 1999. Simulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. Eur. J. Soil Sci. 50: 379-390.

Gen-Fu, W. and Xue-Ping, Z. 2005. Characterization of phosphorus releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. Water Res. 39: 4623-4632.

Gerke, J., Beiβner, L. and Römer, W. 2000. The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on uptake by a single root. The basic concept and determination of soil parameters. J. Plant Nutr. Soil Sci. 163: 207-212.

Goering, H. and Van Soest, P. (1972). Forage fiber analysis. ARS-USD. Agricultural Handbook Nº 379 Washington D.C., United States. 40 p.

Goldberg, S. and Sposito, G. 1984. A chemical model of phosphate adsorption by soils: I. Reference oxides minerals. Soil Sci. Soc. Am. J. 48: 772-778.

Grace, C., Hart, M. and Brookes, P. C. 2006. Laboratory manual of the soil microbial biomass group. Rothamsted Research. U.K.

Griffin, T. S., Honeycutt, C. W. and He, Z. 2003. Changes in soil phosphorus from manure application. Soil Sci. Soc. Am. J. 67: 645-653.

Hansen, J. C., Cade-Menun B. J. and Strawn D. G. 2004. Phosphorus speciation in manure-amended alkaline soils. J. Environ. Qual. 33: 1521- 1527.

Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M. and Boudabous, A., 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Bioresource Technol. 80, 217–225.

Haygart, P. M. and Jarvis, S. C. 1997. Soil derived phosphorus in surface runoff from grazed grassland lysimeters. Water Res. 31: 140-148.

Haynes, R. and Williams, P. 1993. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. Adv. Agron. 49: 119-199.

Haynes, R. J. and Mokolobate, M.S. 2001. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. Nutr. Cycl. Agroecosys. 59: 47-63.

He, Z. and Honeycutt, W. 2001. Enzymatic characterization of organic phosphorus in animal manure. J. Environ. Qual. 30:1685-1692

He, Z., Honeycutt, C. W. and Griffin, T. S. 2003a. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in extracts and resuspensions of swine manure and cattle manure. Biol. Fert. Soils. 38: 78-83.

He, Z., Honeycutt, C. W. and Griffin, T. S. 2003b. Comparative investigation of sequentially extracted phosphorus fractions in a sandy loam soil and swine manure. Commun. Soil Sci. Plan. 34(11&12): 1729-1742.

He, Z., Griffin, T. S. and Honeycutt, C.W. 2004a. Phosphorus distribution in dairy manures. J. Environ. Qual. 33(4): 1528-1534.

He, Z., Griffin, T. S. and Honeycutt, C.W. 2004b. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in swine manure and soil. J. Environ. Qual. 33: 367-372.

He, Z., Toor, G., Honeycutt, C. W. and Sims, T. 2005. An enzymatic hydrolysis approach for characterizing labile phosphorus forms in dairy manure under mild assay conditions. Bioresource Technol. 97: 1660-1668.

He, Z., Fortuna, A-M., Senwo, Z. N., Tazisong, I.A., Honeycutt, C. W. and Griffin, T. S. 2006. Hydrochloric Fractions in Hedley Fractionation May Contain Inorganic and Organic Phosphates. Soil Sci. Soc. Am. J. 70:893–899.

Hedley, M. J., Stewart, J. W. B. and Chauhan, B. S. 1982. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 970-976.

Herter, T., Berezina, O.V., Zinin, N.V., Velikodvorskaya, G.A., Greiner, R. and Borriss, R., 2006. Glucose–1–phosphatase (AgpE) from *Enterobacter cloacae* displays enhanced phytase activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70, 60–64.

Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil. 237: 173-195.

Huang, G.F., Wu, Q.T., Wong, J.W. and Nagar, B.B., 2006. Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust. Bioresource Technol. 97: 1834–1842.

Hyun, S and Lee, L. 2004. Hydrophilic and hydrophobic sorption of organic acids by variable-charge soils: Effect of chemical acidity and acidic functional group. 2004. Environ. Sci. Technol. 38: 5413- 5419.

Igual, J.M., Valverde, A., Cervantes, E. and Velásquez, E., 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. Agronomie. 21: 561–568.

Ishikawa, S., Adu-Gyamfi, J.J., Nakamura, T., Yoshihara, T., Watanabe, T. and Wagatsuma, T. 2002. Genotypic variability in phosphorus solubilizing activity of root exudates. by pigeonpea grown in low-nutrient environments. Plant Soil. 245: 71–81,

Iyamuremye, F., Dick, R. P. and Baham. J. 1996a. Organic amendment and phosphorus dynamics: I. Phosphorus chemistry and sorption. Soil Sci. 161: 426-435.

Iyamuremye, F., Dick, R. P. and Baham. J. 1996b. Organic amendment and phosphorus dynamics: II. Distribution of soil phosphorus fractions. Soil Sci. 161(7): 436-443.

Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M. and Nasu, M. 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. FEMS Microbiol. Ecol. 32, 129–141

Jang, J.C., Shin, P.K., Yoon, J.S., Lee, I.M., Lee, H.S. and Kim, M.N. 2002. Glucose effect on the biodegradation of plastics by compost from food garbage. Polym. Degrad. Stabil. 76, 155–159.

Jeon, J., Lee, S., Kim, H., Ahn, T. and Song, H. 2003. Plant Growth Promotion in Soil by Some Inoculated Microorganisms. J. Microbiol. 41: 271-276.

Jones, D. L. 1998. Organic acid in the rhizosphere – a critical review. Plant Soil. 205: 25-44.

Jones, D. L., Dennis, P.G., Owen, A. G. and van Hees, P. A. W. 2003. Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. Plant Soil. 248: 31-41.

Jorquera, M., Hernandez, M., Rengel, Z., Marschner, P., and Mora, M.L. 2008a. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. Biol. Fert. Soils. DOI 10.1007/s00374-008-0288-0.

Jorquera, M., Hernández, M., Rengel, Z., Marschner, P. and Mora, M. L. 2008b. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. Biol. Fertil. Soils. 44:1025-1034.

Kang, S.H., Cho, K.K., Bok, J.D., Kim, S.C., Cho, J.S., Lee, P.C., Kang, S.K., Lee, H.G., Woo, J.H., Lee, S.C. and Choi, Y.J. 2006. Cloning, sequencing and characterization of a novel phosphatase gene, *pho*I, from soil bacterium *Enterobacter* sp. 4. Curr. Microbiol. 52, 243–248.

Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. and Apajalahti, J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtili.* Appl. Environ. Microbiol. 64, 2079–2085.

Kim, K.Y., Jordan, D. and Krishnan, H.B. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. FEMS Microbiol. Ecol. 153, 273–277.

Kleinman, P. J. A., Wolf, A. M., Sharpley, N. A., Beegle, D. B. and Saporito, L. S. 2005. Survey of Water-Extractable Phosphorus in Livestock Manures. Soil Sci. Soc. Am. J. 69:701–708

Konietzny, U. and Greiner, R .2004. Bacterial phytase: potential aplication, in vivo function and regulation of its synthesis. Braz. J. Microbiol. 35:11–18.

Kpomblekou-A, K. and Tabatabai, M. A. 2003. Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soil. Agr. Ecosyst. Environ. 100: 275-284.

Kwabiah, A. B., Stoskopf, N. C., Palm, C. A., Voroney, R. P., Rao, M. R. and Gacheru, E. 2003. Phosphorus availability and maize response to organic and inorganic fertilizer inputs in a short term study in western Kenya. Agr. Ecosyst. Environ. 95: 49-59.

Laboski, C. A. M. and Lamb, J. A. 2003. Changes in soil test phosphorus concentrations after applications of manure of fertilizer. Soil. Sci. Soc. Am. J. 67, 544-554.

Leinweber, P., Haumaier, L. and Zech, W. 1997. Sequential extractions and ^{31}P-NMR spectroscopy of phosphorus forms in animal manures, whole soils and particle-size

separates from a densely populated livestock area in northwest Germany. Biol. Fert. Soils. 25: 89-94.

Lhadi, E. K., Tazi, H., Aylaj, M., Genevini, P. L. and Adani, F. 2006. Organic matter evolution during co-composting of the organic fraction of municipal waste and poultry manure. Bioresource Technol. 97, 2117–2123.

Lin, T., Huang, H., Shen, F. and Young, C. 2006. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate. Bioresource Technol. 97: 957-960.

Maguirre, R.O., Sims, J. T., Taylor, W.W., Turner, B. L., Angle, R. and Applegate. T. J. 2004. Influence of phytase addition to poultry diets on phosphorus forms and solubility in litters and amended soils. J. Environ. Qual. 33: 2306-2316.

Makarov, M. I., Haumaier, L. and Zech, W. 2002. Nature of soil organic phosphorus: as assessment of peak assignments in the diester region of ^{31}P NMR spectra. Soil Biol. Biochem. 34: 1467-1477.

Makarov, M. I., Haumaier, L., Zech, W., Marfenina, O. E. and Lysak, L. V. 2005. Can ^{31}P NMR spectroscopy be used to indicate the origins of soil organic phosphates?. Soil Biol. Biochem. 37: 15-25.

McDowell, R.W. and Stewart, I. 2005. Phosphorus in fresh and dry dung of grazing dairy cattle, deer, and sheep: sequential fraction and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance analyses. J. Environ. Qual. 34: 598-607.

McDowell, R.W and Stewart, I. 2006. The phosphorus composition of contrasting soils in pastoral, native and forest management in Otago, New Zealand: Sequential extraction and ^{31}P NMR. Geoderma. 130: 176 -189.

Mezenner,N. Y. and Bensmaili, A. 2008. Kinetics and thermodynamic study of phosphate adsorption on iron hydroxide-eggshell waste. Chem. Eng. J. doi:10.1016/j.cej.2008 .06. 024.

Mkhabela, M. S. and Warman, P. R. 2005. The influence of municipal solid waste compost on yield, soil phosphorus availability and uptake by two vegetable crops grown in a Pugwash sandy loam soil in Nova Scotia. Agric. Ecosys. Environ. 106: 57-67.

Mokolobate, M. S. and Haynes, R. J. 2002. Comparative liming effect of four organic residues applied to an acid soil. Biol. Fert. Soils. 35: 79- 85

Mondini, C., Fornasier, F. and Sinicco, T. 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. Soil Biol. Biochem. 36: 1587-1594.

Mora, M. L. and Canales. J. 1995a. Interactions of humic substances with allophanic compounds. Commun. Soil. Sci. Plan. 26(17&18), 2805-2817.

Mora, M. L. and Canales. J. 1995b. Humin-clay interactions on surface reactivity in Chilean andisols. Commun. Soil. Sci. Plan. 26(17&18), 2819-2828.

Mora, M. L., Aguilera, M., Borie, G., Peirano, P. y Demanet, R. 1995. Caracterización de purines para su potencial uso como fertilizante y mejorador de suelos. Agricultura Técnica 55(3-4): 251-256.

Mora, M. L. and Barrow, N. J. 1996. The effects of time of incubation on the relation between charge and pH of soil. Eur. J. Soil Sci. 47: 131-136.

Mora, M.L, Cartes, P., Demanet, R. and Cornforth., I.S. 2002. Effects of lime and gypsum on pasture growth and composition on an acid Andisol in Chile, South America. Commun Soil Sci Plan. 33:2069–2081.

Mora, M.L., Alfaro. M., Jarvis, S.C., Demanet, R. and Cartes, P. 2006. Soil aluminium availability in andisols of southern Chile and its effect on forage production and animal metabolism. Soil Use Manage. 22:95–101.

Murphy, J. and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27, 31–36.

Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett.170, 265-270.

Neumann, G. and Römheld, V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. Plant Soil. 211: 121–130.

Nuruzzaman, M., Lambers, H.,Bolland, M. and Veneklaas, E. 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. Plant Soil. 281:109–120

Nwoke, O. C., Vanlauwe, B., Diels, J., Sanginga, N., Osonubi, O. and Merckx, R. 2003. Assessment of labile phosphorus fractions and adsorption characteristics in relation to soil properties of Wet African savanna soils. Agr. Ecosyst. Environ. 100: 285-294.

Oehl, F., Frossard, E., Fliessbach, A., Dubois, D. and Oberson, A. 2004. Basal organic phosphorus mineralization in soils under different farming systems. Soil Biol. Biochem. 36: 667-675.

Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N.P., Guimaraes, C.T., Schaffert, R. E. and Sá, N.M.H. 2008. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the brazilian Cerrado Biome. Soil Biol. Biochem. doi:10.1016/j.soilbio.2008.01.012

Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-León, J. A. and Soccol, V. T. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. Bioresource Technol. 77, 203-214.

Pant, H. K. and Warman, P. R. 2000. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. Biol. Fert. Soils. 30: 306-311

Parker, D.R., Zelazny, L.W. and Kinraide, T.B. 1987. Improvements to the program GEOCHEM. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 488–491.

Parham, J. A, Deng, S. P., Raun, W.R. and Johnson, G. V. 2002. Long-term cattle manure application in soil I. Effect on soil phosphorus levels, microbial biomass C and dehydrogenase and phosphatase activities. Biol. Fert. Soils. 35: 328-227.

Parfitt, R. L., Yeates, G. W., Ross, D. J., Mackay, A. D. and Budding, P. J. 2005. Relationships between soil biota, nitrogen and phosphorus availability, and pasture grown under organic and conventional management. Appl. Soil. Ecol. 28: 1-13.

Pascual, J. A., Moreno, J. L., Hernández, T. and García, C. 2002. Persistence of immobilized and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. Bioresource Technol. 82: 73-78.

Penn, C. J. and Bryant, R. B. 2008. Phosphorus solubility in response to acidification of dairy manure amended soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 72: 238-243.

Pérez, E., Sulbarán, M., Ball. M.M. and Yarzábal, L.A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuela region. Soil Biol. Biochem. 39:2905-2914.

Pypers, P., Verstraete, S., Thi, C. P. and Merckx, R. 2005. Changes in mineral nitrogen, phosphorus availability and salt-extractable aluminium following the application of green manure residues in two weathered soils of South Vietnam. Soil Biol. Biochem. 37: 163-172.

Raboy, V. 2003. *myo*-Inositol - 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexa*kis*phosphate. Phytochemistry 64: 1033-1043.

Rao, M. A., Violante, A. and Gianfreda, L. 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetic and stability. Soil Biol. Biochem. 32: 1007-1014.

Redel, Y. D., Rubio, R., Rouanet, J. R. and Borie, F. 2007. Phosphorus bioavailability affected by tillage and crop rotation on a Chilean volcanic derived Ultisol. Geoderma. 139: 388-396.

Rengel, Z. and Marschner, P. 2005. Research review Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. New Phytol: 168: 305–312.

Richardson, A.E. and Hadobas, P.A. 1997. Soil isolates of *Pseudomonas spp*. that utilize inositol phosphates. Can. J. Microbiol. 43: 509-516.

Rubio, R., Moraga, E. and Borie, F. 1989. Acid phosphatase activity and vesicular–arbuscular infection associated with roots of four wheat cultivars. J. Plant. Nutr. 13: 585–598.

Sadzawka, A., Grez, R., Carrasco, M. A. y Mora, M. L. 2004a. Métodos de análisis de tejidos vegetales. CNA Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago de Chile. 53 p.

Sadzawka, A., Grez, R., Mora, M. L., Saavedra, N. R., Carrasco, M. A. y Rojas, C. W. 2004b. Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. CNA Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago de Chile. 62 p.

Sadzawka, A., Carrasco, M. A., Grez, R. y Mora, M. L. 2005. Métodos de análisis de compost. CNA Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago de Chile. 101 p.

Salazar, F. J., Dumont, J. C. y Santana, M. A. 2003. Prospección del manejo y utilización de efluentes de lecherías en el sur de Chile. Arch. Med. Vet. 35: 215-225.

Sawyer, D. T. 1964. Metal-gluconate complexes. Chem. Rev. 64(6): 633-643.

Scherer, H. W. and Sharma, S. P. 2002. Phosphorus fractions and phosphorus delivery potential of a luvisol derived from loess amended with organic waste. Biol. Fert. Soils. 35: 414-419.

Shand, C. A. and Smith, S. 1997. Enzymatic release of phosphate from model substrates and P compound in soil solution from a peaty podzol. Biol. Fert. Soils. 24: 183-187.

Sharpley, A. N., McDowell, R. W. and Kleinman, P. J. A. 2004. Amount, forms, and solubility of phosphorus in soils receiving manure. Soil Sci. Soc. A. J. 68: 2048-2057

Sharpley, A. and Moyer, B. 2000. Phosphorus forms in manure and compost and their release during simulated rainfall. J. Environ. Qual. 29: 1462-1469

Shen, H., Yan, X., Zhao, M., Zheng, S. and Wang, X. 2002. Exudation of organic acid in common bean as related to mobilization of aluminum-and iron-bound phosphates. Environ. Exp. Bot. 48: 1-9.

Shen, J., Rengel, Z., Tang, C. and Zhang, F. 2003. Role of phosphorus nutrition in development of cluster roots and release of carboxylates in soil-grown Lupinus albus. Plant Soil. 248: 199–206.

Shu, L., Shen, J., Rengel, Z., Tang, C., Zhang, F. and Cawthray, G. 2007. Formation of cluster roots and citrate exudation by Lupinus albus in response to localized application of different phosphorus sources. Plant Sci. 172: 1017 – 1024.

Singh, C.P. and Amberger, A., 1997. Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. Bioresource Technol. 63, 13-16.

Smith, D. C. and Hughes, J. C. 2004. Changes in maturity indicators during the degradation of organic wastes subject to simple composting procedures. Biol. Fert. Soils. 39: 280-286.

Ström, L., Owen, A. G., Godbold, D. L. and Jones, D. L. 2002. Organic acid mediated P mobilization in the rhizosphere and uptake by maize roots. Soil Biol. Biochem. 34: 703-710.

Ström, L., Owen, A. G., Godbold, D. L. and Jones, D. L. 2005. Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. Soil Biol. Biochem. 37: 2046-2054.

Tabatabai, M.A. and Bremner. J.M. 1969. Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1: 301-307Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. Plant physiology. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts. USA. 792 pp.

Tan, K. H. 1993. Principles of soil chemistry. Second edition. Ed. Dekker. INC. USA.

Tarafdar, J. C. and Claassen, N. 2003. Organic phosphorus utilization by wheat plant under sterile conditions. Biol. Fert. Soils. 39: 25-29.

Taranto, M. T., Adams. M. A., and Polglase, P. J. 2000. Sequential fractionation and characterization (^{31}P-NMR) of phosphorus-amended soils in *Banksia integrifolia* (L.f.) woodland and adjacent pasture. Soil Biol. Biochem. 32: 169-177.

Taylor, G. J. and Foy, C. D. 1985. Mechanisms of aluminum tolerance in Triticum aestivum L. (Wheat). I. Differential pH induced by winter cultivars in nutrient solutions. Amer. J. Bot. 72: 695-701.

Thien, S. J. and Myers, R. 1992. Determination of bioavailable phosphorus in soil. Soil. Sci. Soc. A. J. 56: 814- 818.

Tiquia, S. M. 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. J. Appl. Microbiol. 92: 764-775.

Toor, G. S. and Bahl, G. S. 1999. Kinetics of phosphate desorption from different soils as influenced by application of poultry manure and fertilizer phosphorus and its uptake by soybean. Bioresource Technol. 69: 117-121.

Toor, G. S., Cade-Menun, B. J. and Sims, J. T. 2005. Establishing a linkage between phosphorus forms in dairy diets, feces, and manures. J. Environ. Qual. 34: 1380–1391.

Toor, G., Hunger, S., Peak, J.D., Sims, J.T. and Sparks, D.L. 2006. Advances in the characterization of phosphorus in organic wastes: Environmental and agronomic applications. Adv. Agron. 89, 1–72.

Traoré, O., Sinaj, S., Frossard, E. and Van De Kerkhove, J. M. 1999. Effect of composting time on phosphate exchangeability. Nutr. Cycl. Agroecosys. 55: 123-131.

Turner, B., and McKelvie, I. D. 2002. A Novel technique for the pre-concentration and extraction of inositol hexakisphosphate from soil extract with determination by phosphorus – 31nuclear magnetic resonance. J. Environ. Qual. 31: 466 - 470.

Turner, B. L., McKelvie, I. D. and Haygarth, P. M. 2002a. Characterisation of water-extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis. Soil Biol. Biochem. 34: 27-35.

Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M. and McKelvie, I. D. 2002b. Inositol phosphates in the environmental. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 357: 449-469.

Turner, B., Driessen, J.P., Haygarth, P. M. and Mckelvie, I.D. 2003. Potential contribution of lysed bacterial cells to phosphorus solubilisation in two rewetted Australian pasture soils. Soil Biol. Biochem. 35: 187-189

Turner, B. L. and Haygarth, P. M. 2003. Changes in bicarbonate-extractable inorganic and organic phosphorus by drying pasture soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 67:344–350

Turner, B. L. 2004. Optimizing Phosphorus Characterization in animal manures by solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Environ. Qual. 33,757–766.

Turner, B.L. and Leytem, A.B. 2004. Phosphorus compounds in sequential extracts of animal manures: chemical speciation and a novel fractionation procedure. Environ. Sci. Technol. 38, 6101–6108.

Turner, B. L., Cade- Menun, B. J., Condron, L. M. and Newman, S. 2005. Extraction of soil organic phosphorus. Talanta. 66: 294-306.

Unno, Y., Okubo, K., Wasaki, J., Shinano, T. and Osaki, M. 2005. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of lupin analysed by phytate utilization ability. Environ. Microbiol. 7:396–404.

Verma, S., Subehia, S. K. and Sharma, S. P. 2005. Phosphorus fractions in an acid soil continuously with mineral and organic fertilizer. Biol. Fert. Soils. 41: 295-300.

Vuorinen, A. H. 2000. Effect of the bulking agent on acid and alkaline phosphomonoesterase and ß-D-glucosidase activities during manure composting. Bioresource Technol. 75: 133-138.

Wang, Z. Y. Kelly, J. M. and Kovar, J. L. 2004. In Situ Dynamics of Phosphorus in the Rhizosphere Solution of Five Species. J. Environ. Qual. 33:1387–1392

Wang, X., Tang, C., Guppy, C.N. and Sale, P.W.G. 2008. Phosphorus acquisition characteristics of cotton (Gossypium hirsutum L.), wheat (Triticum aestivum L.) and white lupin (Lupinus albus L.) under P deficient conditions. DOI 10.1007/s11104-008-9589-1

Wolf, A.M., Kleinman, P. J., Sharpley, A. N. and Beegle, D.B. 2005. Development of a Water-Extractable Phosphorus Test for Manure: An Interlaboratory Study. Soil Sci. Soc. Am. J. 69:695–700

Xu, R., Zhao, A. and Ji, G. 2003. Effect of low molecular-weight organic anions on surface charge of variable charge soil. J. Colloid. Interf. Sci. 264: 322-326.

Yadav, R. S. and Tarafdar, J. C. 2001. Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. Biol. Fert. Soils. 34:140-143.

Yadav, R. S. and Tarafdar, J. C. 2003. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. Soil Biol. Biochem. 35: 1-7.

Yanke, L.J., Bae, H.D., Selinger, L. B. and Cheng K.-J., 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. Microbiology. 144: 1565–1573.

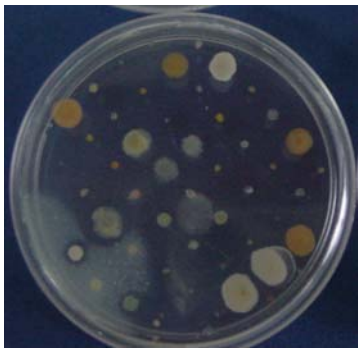
Yamamura, T., Dateki, H., Wasaki, J., Shinano, T. and Osaka, M. 2004. Possibility of rhizosphere regulation using acid phosphatase and organic acid for recycling phosphorus in sewage sludge. Soil Sci. Plant Nutr. 50: 77 - 83.

Yoon, S. J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J. W., Lee, S.C. and Jung, Y. H. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter sp. 4*, and enzymatic properties of phytase enzyme. Enzyme Microb. Technol. 18: 449-454.

Zhang, T. Q., Mackenzie, A. F. and Sauriol. F. 1999. Nature of soil organic phosphorus as affected by long-term fertilization under continuous corn (*Zea Mays L.*): a ^{31}P NMR study. Soil Sci. 164: 662-670.

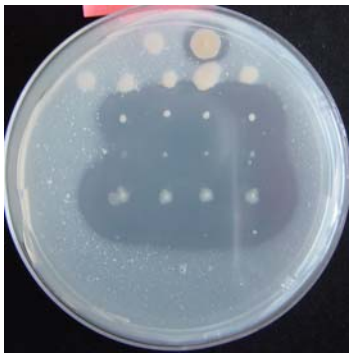
ANEXO 1

Morfotipos de bacterias utilizadoras de fitato (BFU), aislados durante el proceso de degradación aerobia de la excreta de bovino.

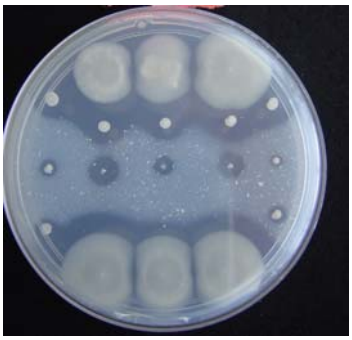


Día 0

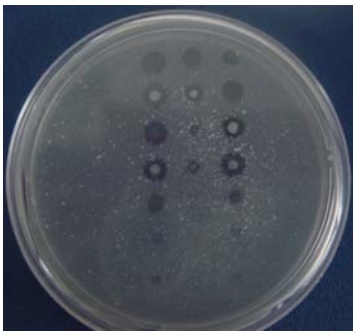
Día 3



Día 6

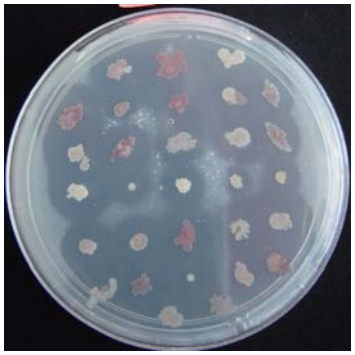


Día 14



Día 35

Día 55



Día 75

Día 95

ANEXO 2

La producción de materia seca y el contenido de P en plantas de *Lolium perenne*, proveniente de los rizotrones con distintas dosis de EBD.

0 g EBD kg^{-1} suelo

3 g EBD kg^{-1} suelo

6 g EBD kg^{-1} suelo

9 g EBD kg^{-1} suelo